

Universidade Estadual de Campinas
Faculdade de Engenharia de Alimentos
Departamento de Engenharia de Alimentos



Estudo da produção de enzimas e gomas por leveduras selvagens coletadas em diversas regiões do Brasil

Abraão Brito Peixoto
Engenheiro de Alimentos

Orientador: Prof. Francisco Maugeri Filho

Dissertação de Mestrado apresentada à
Faculdade de Engenharia de Alimentos da
Universidade Estadual de Campinas para
obtenção do Título de Mestre em
Engenharia de Alimentos.

Campinas – SP

Março de 2006

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FEA – UNICAMP

P359e Peixoto, Abraão Brito
Estudo da produção de enzimas e gomas por leveduras
selvagens coletadas em diversas regiões do Brasil /
Abraão Brito Peixoto. -- Campinas, SP: [s.n.], 2006.

Orientador: Francisco Maugeri Filho
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de
Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos

1. Leveduras. 2. Amilase. 3. Celulase. 4.
Atividade enzimática. 5. Gomas. I. Maugeri Filho,
Francisco. II. Universidade Estadual de
Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. III.
Título.

(cars/fea)

Titulo em inglês: Study of enzymes and gums production by wild yeasts
collected

from various Brazilian regions

Palavras-chave em inglês (Keywords): Yeast, Amylase, Cellulase, Enzymatic
activity, Gum

Titulação: Mestre em Engenharia de Alimentos

Banca examinadora: Francisco Maugeri Filho

Maria Isabel Rodrigues

Hélia Harumi Sato

Daniel Ibraim Pires Atala

Membros da Banca Examinadora

Francisco Maugeri Filho (Orientador)
DEA - FEA - Unicamp

Maria Isabel Rodrigues
DEA - FEA - Unicamp

Hélia Harumi Sato
DCA - FEA - Unicamp

Daniel Ibraim Pires Atala
DEA - FEA - Unicamp



Agradeço a todos aqueles que estiveram direta ou indiretamente ligados à conclusão deste trabalho. Em especial, agradeço ao meu orientador, Francisco Maugeri Filho, pelo apoio constante e guiança indelével; à professora Maria Isabel Rodrigues pela tutela e lapidação desta obra e aos professores Daniel Atala e Hélia Harumi Sato por comporem a banca e também contribuírem para o término deste feito.

Também agradeço ao pessoal do LEB por me fazerem sentir em casa e me ajudarem a transformar o trabalho num hobby. Meus sinceros agradecimentos a Fifa, Saartje, Guilopes, Luciano, Eliane, Geraldo, Elizama, Danilo, Pedro, Rafael, Olga, Ciça, Lílian, Angélica e à Farmacêutica Ana Cláudia, que me acompanhou no início deste trabalho.

Agradeço à minha orientadora de Iniciação Científica da UFV, Sandra Maria Couto (com muito carinho!) e aos doutores Ednilton Tavares e Ivano Devilla por me apresentarem os trâmites da pesquisa científica.

Meus profundos obséquios a minha companheira de jornada Aninha, aos amigos: Alê, Lizi, Louise, Douglas, Fezinha, Márcia, Nara, Marcelo (Tchê), Roque, Pitico, Feni, Oswaldo, Genivas e Cráudio por tornarem a minha vida pessoal uma dádiva repleta de amizades sinceras.

Aos meus amigos de infância de Ibicuí-BA: Kinho, Sandro, Maurício, Alan, Wagner, Isaac, José Alberto, Fábio, Murilo, Antônio Henrique, Mateus e Tiago. Aos primos: Matheus, Thainá, Raoni e Elzinha e a todos que contribuíram para minha formação pessoal, moldando meu comportamento até me tornar hoje o que sou.

Enfim, agradeço a Deus por ter tantos a quem agradecer e por me ofertar o milagre da vida.



Esta obra é dedicada ao meu pai Ebenezer Vaz Peixoto (em memória), minha mãe Laurinda Brito Peixoto, minhas tias Joana Brito Santos e Terezinha Brito Fontes, ao meu tio Paulino Vaz Peixoto, às minhas avós Erondina Peixoto Brito e Almerinda Vaz Pinheiro, aos amigos-irmãos: Allan, Jó, Jábison, Mário, Raqui, Jan, Moabe e à mulher com quem compartilho minhas bem vividas horas de vida, Aninha.



As intempéries do nosso cotidiano são sopros cálidos de braços caridosos no intuito de nos revelar o caminho.

Sumário

Índice de Figuras	ix
Índice de Tabelas	xi
Resumo	xii
Abstract.....	xiv
1. Introdução.....	1
2. Revisão Bibliográfica	3
2.1 As Leveduras	3
2.2 Amido e Amilases	5
O Amido	5
Características Tecnológicas do Amido	10
Tecnologia das Amilases	12
2.3. Celulose e Celulases	17
A Celulose.....	17
Estrutura Molecular da Celulose	18
Anomalias estruturais.....	20
Tamanho da molécula.....	21
Estrutura Secundária.....	22
Propriedades Físicas da Celulose	24
Propriedades Químicas da Celulose	25
Tecnologia da Celulase	26
As Hemicelulases.....	30
Comportamento Microbiano Frente à Produção da Celulase	31

Considerações sobre a Produção da Celulase	32
Métodos de Determinação de Atividade de Celulases.....	34
2.4 Gomas.....	36
Goma Dextrana.....	39
Goma Xantana	44
3. Material e Métodos	48
Obtenção das leveduras	48
Triagem das Leveduras Produtoras de Amilases	50
Atividade Amilolítica em Meio Sólido	51
Atividade Amilolítica em Meios Agitados	52
Triagem das Leveduras Produtoras de Celulases.....	54
Atividade Celulolítica em Meio Sólido	55
Atividade Celulolítica em Meios Agitados	56
Triagem das Leveduras Produtoras de gomas	58
4. Resultados e Discussão	60
Os Processos de Triagem.....	60
Atividade Enzimática em Meio Sólido.....	62
Atividade Enzimática em Meio Líquido.....	66
5. Conclusões	71
6. Sugestões para Trabalhos Futuros	75
7. Referências	76

Índice de Figuras

Figura 1 - Microfotografia de levedura do gênero <i>Candida</i> . Fonte: www.rkm.com.au/imagelibrary/	4
Figura 2 - Etapas envolvidas na retrogradação dos grânulos de amido.	8
Figura 3 - Comportamento dos grânulos de amido durante a gelatinização.	11
Figura 4 - Esquema da degradação da molécula de amido pelas amilases.	14
Figura 5 - Representação da molécula de celulose: a) estrutura tridimensional da molécula; b) estrutura convencional com destaque para as posições das ligações glicosídicas $\beta(1-4)$	19
Figura 6 - A) pilha do retículo cristalino de celulose I; B) corte transversal sob comparação entre a celulose I (nativa) e a celulose II (mercerizada). Fonte: http://www.av.fh-koeln.de	23
Figura 7 - Micrografia eletrônica das fibrilas elementares da fibra de celulose natural....	24
Figura 8 - Mecanismo de ação das celulasas sobre cadeias de celulose. A celulose original possui tanto a parte cristalina quanto a parte amorfa.	29
Figura 9 – Ilustração da estrutura da dextrana.....	40
Figura 10 - Estruturas moleculares dos compostos: (a) sulfato de dextrana e (b) DEAE-dextrana (dietilaminoetil-dextrana).	43
Figura 11 - Estrutura molecular da xantana. A unidade molecular representada na figura se repete. Este fator determina o peso molecular da goma.	47
Figura 12 - Representação esquemática do fundo de uma placa de Petri dividida em 8 câmaras com as regiões demarcadas (\square : região reservada à identificação da cepa de levedura testada; \bigcirc : região reservada à inoculação do microrganismo).	50

Figura 13 - Cultura de <i>Xanthomonas campestris</i> produtora de goma xantana em meio com sacarose.	59
Figura 14 - Resultados obtidos na triagem dos microrganismos produtores de amilases (a) e celulasas (b), antes e depois da coloração, e de gomas (c) em meio sólido.....	60
Figura 15 - Análise dos desvios e erros das médias de atividade enzimática de amilases das leveduras pré-selecionados através da formação de halos de hidrólise em meio sólido contendo amido.	63
Figura 16 - Análise dos desvios e erros das médias de atividade enzimática de celulasas das leveduras pré-selecionadas através do teste em Placas de Petri.	64
Figura 17 - Atividades das amilases das leveduras a 40 °C, 50 °C e 60 °C.	66
Figura 18 - Atividade amilolítica da cepa AH ₆ -1 nas temperaturas 40 e 50 °C.....	67
Figura 19 - Atividade de CMCase a 45 e 60 °C.....	68
Figura 20 - Atividade de celobiase. Enzimas produzidas em tempos de 120 e 240 h em meios agitados a 150 rpm e 30 °C.	69
Figura 21 - Atividade de FPase. Enzimas produzidas em tempos de 120 e 240 h em meios agitados a 150 rpm e 30 °C.	70

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Variação da temperatura de gelatinização de grânulos de amido oriundos de fontes distintas.....	11
Tabela 2 - Grau de polimerização de moléculas de celulose de várias origens.	21
Tabela 3 - Valores das constantes cinéticas α , K_m e K_p . Concentração em g/L.....	22
Tabela 4 - Crescimento mássico de moléculas de celulose de distintas origens.	25
Tabela 5 - Efeitos da adição de glicose para a indução da produção de celulase com e sem controle de pH.....	34
Tabela 6 – Relação dos microrganismos da cultura estoque coletados em distintas regiões do Brasil. CE: microrganismos coletado no Cerrado; FA: Floresta Amazônica; MA I: Mata Atlântica (vegetação próxima ao mar); MA II: Mata Atlântica (vegetação interiorana); PA: Pantanal; XA: microrganismos isolados de xarope; RQ: isolados de resíduo de queijo; SC: microrganismo sem codificação ou de origem desconhecida.....	49
Tabela 7 – Leveduras selecionadas da triagem de produção de gomas.....	61
Tabela 8 – Porcentagem de leveduras selecionadas dos processos de triagem.	61
Tabela 9 – Médias dos índices de atividade enzimática (IEA) de amilases das leveduras em meio sólido.....	62
Tabela 10 - Médias dos índices de atividade enzimática (IEA) de celulasas das leveduras em meio sólido.....	65

Estudo da produção de enzimas e gomas por leveduras selvagens coletadas em diversas regiões do Brasil

Resumo

Leveduras têm sido pouco estudadas na produção de amilases, celulasas e gomas. As amilases podem ser utilizadas tanto na indústria de alimentos quanto na farmacêutica e química. Cada aplicação requer uma peculiaridade quanto à especificidade, estabilidade, temperatura e pH. Fungos e bactérias são as fontes mais comuns de α -amilase para uso comercial e para a pesquisa científica. As enzimas envolvidas na degradação da celulose são denominadas “complexo celulase”. A aplicação de celulasas produzidas por via microbiana em indústrias de papel e celulose pode viabilizar uma redução significativa do impacto ecológico promovido por este tipo de indústria. Gomas são polissacarídeos de alto peso molecular de origem vegetal ou microbiana que podem ser dissolvidos ou dispersados em água. Estes polissacarídeos desempenham papel importante como componente da maioria dos alimentos, uma vez que podem alterar expressivamente as propriedades reológicas de fluidos. Neste experimento foram selecionadas cepas de leveduras selvagens coletadas na Floresta Amazônica, Pantanal, Mata Atlântica e Cerrado capazes de produzir as enzimas dos complexos amilase e celulase (CMCase - carboximetilcelulase, celobiase e FPase – atividade em papel de filtro) e, ainda, gomas. Em primeira instância, realizou-se uma triagem com verificação da capacidade produtiva das enzimas e gomas em meio sólido. Numa segunda etapa, as leveduras selecionadas do processo de triagem foram submetidas à produção das enzimas ainda em meios sólidos, com determinação da atividade. As cepas que produziram enzimas com maior atividade em meios sólidos foram

também testadas em meios líquidos sob agitação de 150 rpm em temperatura controlada de 30 °C por 96 h para produção de amilases e 120 ou 240 h para produção de celulasas. As leveduras potencialmente produtoras de gomas foram selecionadas comparando-se a similaridade das colônias com as da bactéria *Xanthomonas campestris* em meio de cultura seletivo. Das 390 cepas testadas no processo de triagem, foram selecionadas 45 cepas, consideradas potencialmente produtoras de amilases (12,31 %); 84 (21,54 %), produtoras de CMCase; 46 (11,79 %), produtoras de celulasas e 35 (8,97 %), produtoras de gomas. Entre as leveduras previamente selecionadas como produtoras de enzimas em meio sólido, foram escolhidas 5 cepas produtoras de amilases e 15 produtoras de celulasas para o estudo de produção de enzimas em frascos agitados. A levedura AAO₁₅, coletada na região do Cerrado foi selecionada como maior produtora de amilase, sendo que a enzima apresentou maior atividade a 60 °C. Quanto à produção de celulasas, se destacaram as cepas AQ₆ na produção de CMCase e celobiase e AY₇ na produção de FPase, coletadas na Floresta Amazônica e Mata Atlântica, respectivamente.

Palavras-chave: leveduras, amilase, celulase, atividade enzimática, gomas.

Study of enzymes and gums production by wild yeasts collected from various Brazilian regions.

Abstract

The production of amylases, cellulases and gums by yeasts has a great importance on different areas, however only a few studies has been found in literature. Amylases are enzymes that may be used in different areas, such as food, pharmaceuticals and chemical industry. Each application requires specific conditions of specificity, stability, temperature and pH. Fungae and bacteria are most common source of α -amylase for commercial use and scientific research. The applicability of cellulase produced by microbial way on paper and cellulose industry leads to a significant reduction on environmental impact of these industries. Gums are high molecular polysaccharides from vegetal or microbial origin that may be dissolved or dispersed in water. Such polysaccharides play an important role in food formulation, once they can strongly modify rheological properties of fluids. In this study, different varieties of wild yeasts collected from various Brazilian regions were screened in order to evaluate their ability to produce amylase, cellulase and gums. A first screening was carried out to evaluate the ability of production of enzymes and gums in solid media. The enzymatic activity of the previously screened yeasts was calculated. The varieties with higher activity were tested in stirred media at 150 rpm and 30 °C for 96 hours for amylase, and 120 and 240 hours for cellulase. To evaluate the ability for gum production, yeasts with colonies similar to the ones of *Xantomonas Campestris*, at analogous conditions, were considered. Initial screening tested 390 varieties: 45 varieties produced amylase (12,31 %), 84 (21,54 %), produced CMCase; 46 (11,79 %), produced cellulases and 35 (8,97 %), produced gums. In solid media, 5 and 15 yeasts were selected for the study of amylase and cellulase production, respectively. Such yeasts were

submitted to stirred media assays. The coded AAO₁₅ yeast, from “Cerrado”, has shown the highest amylolytic activity at 60 °C. For cellulolytic activity, coded yeast AQ₆ from Amazon Forest, has shown higher CMCase and cellobiase activity, while AY₇, from Mata Atlantica, has shown higher FPase activity.

Key words: yeast, amylase, cellulase, enzymatic activity, gum.

1. Introdução

O Brasil possui uma área de, aproximadamente, 8,5 milhões km², com várias zonas climáticas que incluem o trópico úmido, o semi-árido e áreas temperadas. As diferenças climáticas contribuem para as diferenças ecológicas formando zonas biogeográficas distintas (biomas). A variedade de biomas reflete a riqueza da flora e fauna brasileira, tornando-as como sendo das mais diversas do mundo.

A biodiversidade inclui a variedade genética dentro das populações e espécies: a variedade de espécies de flora e fauna; das funções ecológicas desempenhadas pelos organismos nos ecossistemas e nas comunidades, habitats e ecossistemas formados pelos organismos.

A composição total da biodiversidade brasileira não é conhecida e talvez nunca venha a ser, sabendo-se, entretanto, que o número de espécies ainda não identificadas pode alcançar a ordem de dezena de milhões. Neste contexto é fundamental a implementação de programas na busca de um melhor aproveitamento da biodiversidade brasileira.

No entanto, essa diversidade, ao mesmo tempo em que representa uma excepcional riqueza de patrimônio genético e paisagístico, torna o ecossistema extremamente frágil. A destruição de parcelas, ainda que pequenas, destes ecossistemas pode significar a perda irreversível de inúmeras espécies, por vezes sequer estudadas pela ciência (IBAMA, Ministério do Meio Ambiente, 2005).

No contexto da biodiversidade, é válido ressaltar o potencial focado em isolar microrganismos produtores de agentes importantes tanto na indústria farmacêutica e cosmética quanto na alimentícia. Nesta última, seria de grande importância a descoberta

de novos microrganismos produtores de insumos de interesse biotecnológico, tendo em vista sua grande área de aplicação como coadjuvantes de tecnologia.

Em suma, este trabalho teve por objetivo geral a seleção de leveduras selvagens que produzam compostos de interesse à indústria de alimentos tais quais os complexos enzimáticos das amilases e celulasas e, ainda, a capacidade da produção de gomas por meio de uma metodologia eficiente com foco na discriminação rápida dos microrganismos com potencial produtivo.

Como objetivo específico, a atividade enzimática tanto em meios sólidos quanto em meios líquidos sob agitação foi também determinada para ambos os complexos enzimáticos.

2. Revisão Bibliográfica

2.1 As Leveduras

As leveduras são as mais antigas fontes de proteínas unicelulares. A *Saccharomyces cerevisiae* tem sido usada há varias décadas na alimentação animal.

Leveduras, vivas ou não, possuem na sua composição uma fração de carboidratos (20% a 40%) que, em grande parte, fazem parte da parede celular, que é composta principalmente por β -glucanos e mananos, os quais têm impacto no sistema imunológico e a capacidade de prevenir a colonização de bactérias patogênicas no trato gastrointestinal.

Leveduras são fungos com variada distribuição no ecossistema. Diferenciam-se dos bolores por se apresentarem, usual e predominantemente, sob forma unicelular. Como células simples, as leveduras crescem e se reproduzem mais rapidamente em relação aos bolores. Também são mais eficientes na realização de alterações químicas, devido à sua maior relação área/volume. São facilmente diferenciadas das bactérias em virtude das suas dimensões maiores e de suas propriedades morfológicas. São células eucarióticas e heterotróficas, possuem uma parede rígida e se reproduzem sexuada ou assexuadamente. A maioria das que têm importância em alimentos se divide por gemulação ou por fissão. As células típicas de leveduras têm um diâmetro que oscila entre 5 μ m e 8 μ m, podendo ser menores em cultivos velhos. São capazes de crescer dentro de amplos intervalos de pH ácido e em concentrações de etanol de até 18%. Algumas leveduras crescem em concentrações de sacarose de 55-60% e produzem pigmentos, cuja cor varia do amarelo claro ao vermelho, passando pelo rosa (JAY, 1992).

Um exemplo da estrutura celular de uma levedura pode ser apreciada por meio da Figura 1.

Em produtos fermentados por bactérias lácticas, o abaixamento do pH permite o crescimento das leveduras (DEKETELERA, 1974).

As leveduras crescem mais lentamente em culturas não agitadas. Em aerobiose, crescem de modo a favorecer a produção de biomassa. Em anaerobiose ou baixas tensões de oxigênio, a produção de etanol é mais favorecida que o crescimento. As colônias crescidas em meio sólido adquirem aspecto pastoso, podendo formar ascósporos.

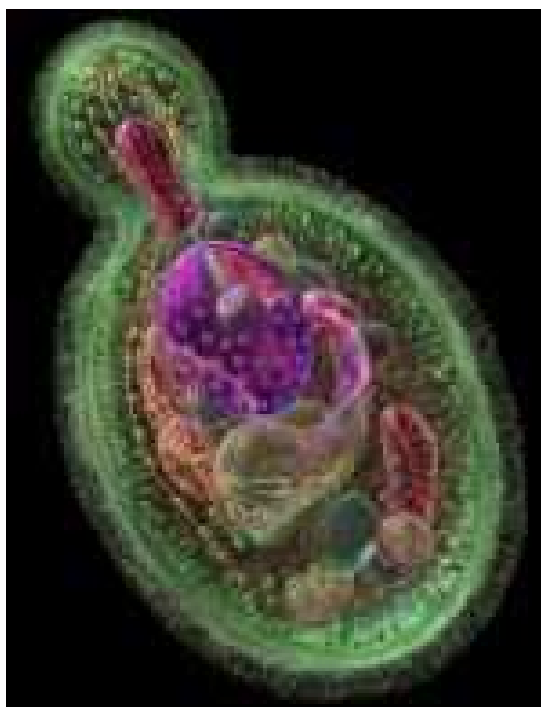


Figura 1 - Microfotografia de levedura do gênero *Candida*. Fonte: www.rkm.com.au/imagelibrary/

A recente descoberta da capacidade de algumas leveduras em degradar amido tem aumentado o potencial em aplicações biotecnológicas como fonte de enzimas hidrolíticas para a produção de proteínas celulares ou etanol a partir de amido.

Uma nova enzima, a *thiol specific antioxidant* (TSA), varredora de H_2O_2 , foi descoberta em leveduras por BOSCHERO (2005).

WANDERLEY et al. (2004) isolaram leveduras de “baixa degradação” de amido a partir de frutas. Os microrganismos foram classificados por critérios moleculares e bioquímicos, deflagrando a existência de uma nova variante de *Cryptococcus flavus*.

2.2 Amido e Amilases

O Amido

O amido constitui-se numa importante reserva de nutrição de todas as plantas superiores (sementes, tubérculos, rizomas e bulbos). Pelo fato de ser facilmente hidrolisado e digerido é um dos elementos mais importantes da alimentação humana.

O amido, depois da celulose, é o componente mais abundante processado pela célula vegetal (SWINKELS, 1985). É constituído de cerca de 14000 monômeros de α -D-glicose. Sua estrutura é constituída por dois polímeros: a amilose (que possui cadeia glicosídica na forma helicoidal) e amilopectina (com cadeias ramificadas) (RUNDLE, 1943; SWINKELS, 1985; GALLIARD, 1987). Além disto a amilose forma géis firmes após o resfriamento e tem grande tendência a precipitar, enquanto que a amilopectina apresenta geleificação lenta ou inexistente, precipitação lenta e textura gomosa e coesiva.

O amido é sintetizado em estruturas vegetais denominadas plastídeos: cromoplastos das folhas e amiloplastos de órgãos de reserva, a partir da polimerização da glicose, resultante da fotossíntese. Estudos de microscopia ótica sugerem que os grãos de amido começam a se formar entre 10 e 15 dias após ter ocorrido a polinização (WHISTLER et. al., 1957).

Como reserva permanente de alimento para a planta, o amido ocorre nas sementes, bem como na medula, nos raios medulares e no córtex de caules e raízes de

plantas perenes e outras. Constitui de 50 a 65 % do peso das sementes de cereais secos, e até 80% da substância seca dos tubérculos. Ocorre em grânulos que têm estrias típicas. Estas, aliadas ao tamanho e à forma dos grânulos, são específicas de cada espécie de planta e podem servir de meio de identificação microscópica da origem botânica deste carboidrato (GALLIARD, 1987).

A biossíntese do amido ocorre, resumidamente, em três etapas:

1ª Etapa: a enzima fosforilase converte a glicose em glicose-1-fosfato.

2ª Etapa: A enzima ADPGppase (adenosina difosfato glicose pirofosforilase) converte a glicose-1-fosfato em ADPG (adenosina difosfato glicose).

3ª Etapa: Enzimas convertem ADPG em cadeias de glucana (amilose e amilopectina).

Para utilização em grande escala, o amido industrial é constituído por grânulos extraídos do grão maduro do milho (*Zea mays*), do grão maduro do trigo (*Triticum aestivum*), dos tubérculos da batata (*Solanum tuberosum*) ou de raízes de mandioca (*Manihot esculenta*). Tem distintos empregos comerciais, servindo de goma na fabricação de papéis e tecidos e em lavanderia. Serve de matéria-prima para a fabricação de xaropes, dextrose, dextrinas e adoçantes com alto teor de frutose.

Os grãos de amido de milho são descritos na literatura como sendo simples, com suas camadas de deposição muito tênues de aproximadamente de 0,5 μm , podendo chegar a 0,1 μm , o que dificulta a visualização microscópica para distinção entre as camadas. Em contrapartida, o amido de batata possui camadas que variam em torno de 2 a 7 μm (WHISTLER et. al., 1955).

A amilose é uma molécula composta de 250 a 300 unidades de D-glicopirranose ligadas uniformemente por pontes glicosídicas $\alpha(1-4)$, que conferem forma helicoidal à molécula.

A amilopectina é também unida por ligações $\alpha(1-4)$. No entanto, há pontos de ramificação onde existem ligações $\alpha(1-6)$. Esse tipo de ponte constitui cerca de 4% das ligações totais, ou seja, uma a cada 25 unidades de glicose, aproximadamente, no amido.

Devido a essas diferenças estruturais, a amilose é mais hidrossolúvel que a amilopectina e essa característica pode ser usada para separar esses dois componentes. A amilose reage com o iodo e forma um complexo azul-escuro; a amilopectina produz cor azul-violácea ou púrpura. No caso da amilose, que possui conformação helicoidal, acredita-se que a cor azul intensa seja resultante da adsorção do iodo (na forma I_5^-) nestas cadeias (TEITELBAUM et. al., 1980). Desta forma, o amido solúvel comercializado para uso como indicador deve consistir basicamente da amilose separada da amilopectina.

A maioria dos amidos tem proporções semelhantes de amilose e amilopectina: em média 25% da primeira e 75% da segunda. Em certos amidos cerosos ou glutinosos a proporção de amilose pode ser pequena (menos de 6%) ou nula. A solução de amido, se não preservada convenientemente, decompõe-se em poucos dias, principalmente por causa de ações bacterianas e os produtos de sua decomposição podem consumir iodo e também interferir nas propriedades indicadoras do amido. A sensibilidade da reação do amido com o iodo aumenta com o aumento da temperatura e na presença de álcool etílico ou metílico.

Quando segmentos lineares de cadeias poliméricas adjacentes encontram-se dispostos paralelamente, podem efetuar ligações de hidrogênio, formando micelas cristalinas. Estas são responsáveis pela integridade que pode ser identificada microscopicamente sob luz polarizada.

Em uma dada temperatura no processo de aquecimento, a energia cinética do sistema é suficiente para enfraquecer as ligações de hidrogênio no interior do grânulo, resultando na desorganização granular e hidratação dos polímeros naturais. Dá-se então

início ao processo de **gelatinização**, o qual promove mudanças irreversíveis: inchamento dos grânulos, fusão das micelas cristalinas, solubilização do amido e perda da birrefringência.

Durante o inchamento dos grânulos, e como consequência disto, algumas moléculas de amilose passam do grânulo para a solução. É também observado o aumento da viscosidade até o ponto em que o aumento da temperatura provoca o rompimento dos grânulos, liberando as moléculas de amilose e amilopectina.

À medida que a dispersão é resfriada, inicia-se um processo irreversível denominado **retrogradação**, onde as moléculas de amilose tendem a se realinhar, restabelecendo as ligações de hidrogênio quebradas com o aquecimento.

A Figura 2 resume as etapas envolvidas no aquecimento do amido.

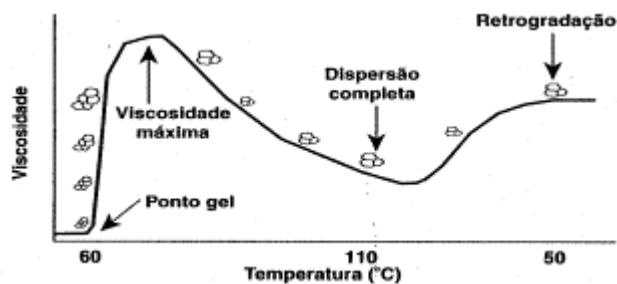


Figura 2- Etapas envolvidas na retrogradação dos grânulos de amido.

Os amidos de origens diferentes retrogradam a taxas diferentes devido à porcentagem de amilose presente nos grânulos. As proporções de amilose e amilopectina influem na viscosidade e no poder de geleificação do amido (BOBBIO & BOBBIO, 1992).

Além da origem, outros fatores exercem influência na taxa de retrogradação, tais como a temperatura, que implica numa taxa de retrogradação mais elevada entre 70 e 85

°C; tempo de estocagem, que se correlaciona diretamente com a retrogradação; concentração: quanto menor a concentração, formam-se precipitados insolúveis, porém, quanto maior a concentração, há formação de géis; pH: quanto menor o pH, maior a taxa de retrogradação; tempo de resfriamento: quanto maior o tempo de resfriamento, maior a taxa de retrogradação.

As propriedades físicas do amido podem ser alteradas pelo tratamento mecânico. Se no estado seco a integridade granular é interrompida, como, por exemplo, pela moagem, o grânulo se torna mais frágil, e o amido se gelatiniza mais rapidamente em água fria. Além disso, o grânulo é facilmente atacado pelas enzimas e produtos químicos.

Valores específicos de rotação óptica $[\alpha]_D$ para amidos oscilam entre 180 a 220°; para amilose pura e frações de amilopectina, $[\alpha]_D$ é 200°. Medidas desses valores são dificultados pelo limite de solubilidade desses polímeros e a opacidade de algumas de suas dispersões.

A hidrólise ácida de amidos é comumente realizada pelo uso de ácido clorídrico. A patente PI 0002001 em "Hidrólise fosfórica de amidos" (FONTANA, 2002) refere-se ao processo aplicável nas indústrias alimentícia ou médico-farmacêutica ou química para a hidrólise fosfórica de amidos ou féculas ou cultivares tuberosos ou cereais ricos em amiláceos, enquanto alternativa à hidrólise clorídrica convencional, o qual é executado usando como catalisador o ácido fosfórico diluído entre pH 5,0 e 1,0 ou mais concentrado, mediante simples aquecimento ou aquecimento sob pressão, ou termopressurização, durante tempos variáveis de residência no reator a partir de soluções ou suspensões diluídas ou concentradas destes materiais amiláceos.

Este processo tem o objetivo de produzir soluções ou xaropes enriquecidos em glicose ou maltose ou oligossacarídeos com grau de polimerização acima de 3 ou maltodextrinas, mantendo ou não o catalisador como tal ou neutralizado em ditos produtos, os quais, comparativamente à hidrólise clorídrica, exploradas as condições

cinéticas de pH, temperatura e tempo de reação, vêm acompanhados de menor teor de subprodutos coloridos ou incolores, insípidos ou não, como hidroximetilfurfural ou subprodutos, similares ou não, oriundos da desidratação ou condensação de açúcares liberados do amido ou de outros carboidratos contaminantes e mesmo de proteínas ou lipídios residuais, caso féculas menos purificadas sejam hidrolisadas.

O heptamido é um material semi-sintético preparado de tal maneira que é constituído por aproximadamente 90% de amilopectina, com sete ou oito substituintes de hidroxietila para cada dez unidades de glicose. Usa-se uma solução de 6% de heptamido como expensor do plasma. Trata-se de terapia auxiliar no tratamento do choque causado por hemorragia, queimadura, cirurgia, sepsia e outros traumas. A duração da melhora do estado hemodinâmico é de vinte e quatro a trinta e seis horas. O polímero é degradado e as moléculas com peso molecular inferior a 50000 são rapidamente eliminadas por excreção renal.

Características Tecnológicas do Amido

Dilatância

O amido em estado natural não é solúvel em água fria. Em certas concentrações, quando solubilizado, torna-se um fluido dilatante, ou seja, o fluxo desse fluido é inversamente proporcional à pressão que é exercida; quanto maior a pressão, menor a fluidez.

Gelatinização

É a quebra das pontes de hidrogênio através da ação do calor ou pela ação de agentes químicos como álcalis. Essa modificação passa por três fases distintas: 1ª fase: o

grânulo é aquecido e entumecido levemente e o efeito é reversível. A viscosidade praticamente não se altera (Figura 3 – 1 e 2); 2ª fase: o grânulo entumece, aumentando várias vezes seu tamanho, a viscosidade aumenta rapidamente, ocorre ainda nesta fase a perda de birrefringência do grânulo de amido (Figura 3 – 3 a 6); 3ª fase: com o aumento da temperatura, o grânulo perde por completo sua forma para transformar-se em hidrogel uniforme (Figura 3 – 7 e 8).

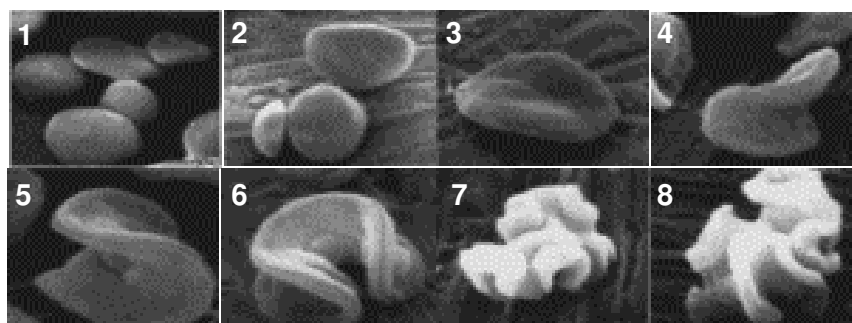


Figura 3- Comportamento dos grânulos de amido durante a gelatinização.

A Tabela 1 ilustra a temperatura de gelatinização do amido de diferentes fontes (FIOS, 2006).

Tabela 1 - Variação da temperatura de gelatinização de grânulos de amido oriundos de fontes distintas.

Origem do grânulo	Temperatura (°C)
Milho	62 – 72
Waxy corn	62 – 72
Trigo	70 – 75
Mandioca	52 – 64
Batata	58 – 66

Retrogradação

A retrogradação é um processo de cristalização das moléculas de amido. Esta cristalização ocorre pela forte tendência de formação de ligações de hidrogênio formadas pelos grupos -OH das unidades de glicose. Nestes grupos, o oxigênio tende a atrair o par de elétrons que compartilha com o hidrogênio. Como consequência, o átomo de hidrogênio adquire o caráter de próton e tende a partilhar os elétrons livres dos átomos de oxigênio vizinhos, formando ligações de hidrogênio entre as moléculas adjacentes. As associações das moléculas do amido propiciam o desenvolvimento de uma "rede" tridimensional, mantida coesa pelas áreas cristalinas. Esta rede é formada por grânulos de amido parcialmente inchados e componente do amido em solução.

Tecnologia das Amilases

Mudanças no amido com o uso de amilases podem alterar a forma como este se retrograda.

Alguns microrganismos, inoculados em meios de cultura apropriados, segregam quantidades apreciáveis de amilases. As amilases produzidas por microrganismos termofílicos apresentam características termoestáveis em relação àquelas produzidas por mesófilos e são de grande interesse na indústria de processamento de amido, pois a temperatura de gelatinização do amido, etapa importante do processo, pode atingir 70 °C. Além disso, os processos que ocorrem sob altas temperaturas, adquirem menor risco de contaminação por mesófilos e a diminuição da viscosidade do meio permite a utilização de elevadas concentrações de substrato. Assim, o processamento industrial do amido requer, essencialmente, enzimas amilolíticas que atuem sob altas temperaturas (UGURU et. al., 1997).

Amilases bacterianas (obtidas principalmente por meio do *Bacillus subtilis*) são enzimas que liquefazem o amido e que se utilizam na fabricação de adesivos ou de revestimentos à base de amido para papéis, em panificação e em outras indústrias alimentícias ou ainda na fabricação de produtos de desengomagem empregados na indústria têxtil.

Amilases fúngicas são essencialmente α -amilases provenientes de culturas de bolores, principalmente dos gêneros *Rhizopus* ou *Aspergillus*. Embora apresentem considerável poder de liquefação, amilases bacterianas possuem maior eficiência nesse processo. No entanto, a produção de amilase por fungos filamentosos varia de acordo com o gênero e a espécie envolvida (NWUFO et. al, 1988).

A α -amilase (1,4- α -glucano 4-glucanoidrolase; EC 3.2.1.1) é uma endo-glucohidrolase que confere a um organismo a capacidade de degradação de polissacarídeos que possuem ligações glicosídicas do tipo $\alpha(1-4)$, tais quais glicogênio e amido, que são os componentes em maior evidência em animais e plantas respectivamente. A amilase pode ser utilizada tanto na indústria de alimentos quanto farmacêutica e química.

As glucoamilases, ou amiloglicosidases (1,4- α -glucano glicoidrolase; EC 3.2.1.3) obtidas de fungos dos gêneros *Rhizopus* ou *Aspergillus* são poderosos agentes sacarificantes, mas não possuem atividade de liquefação do amido. São utilizadas em substratos amiláceos para obtenção de elevado rendimento de glicose.

A molécula de amido original quando em contato com a α -amilase, se converte em oligossacarídeos, alterando as propriedades reológicas da solução que o contém até a formação de α -limite dextrina e glicose. As β -amilases atuam sobre a extremidade não redutora do amido, formando unidade de maltose e β -limite dextrina. As amiloglicosidases atuam sobre as ligações $\alpha(1-4)$ com formação direta de glicose, porém de forma lenta. Uma simplificação do mecanismo pode ser apreciada por meio da Figura 4.

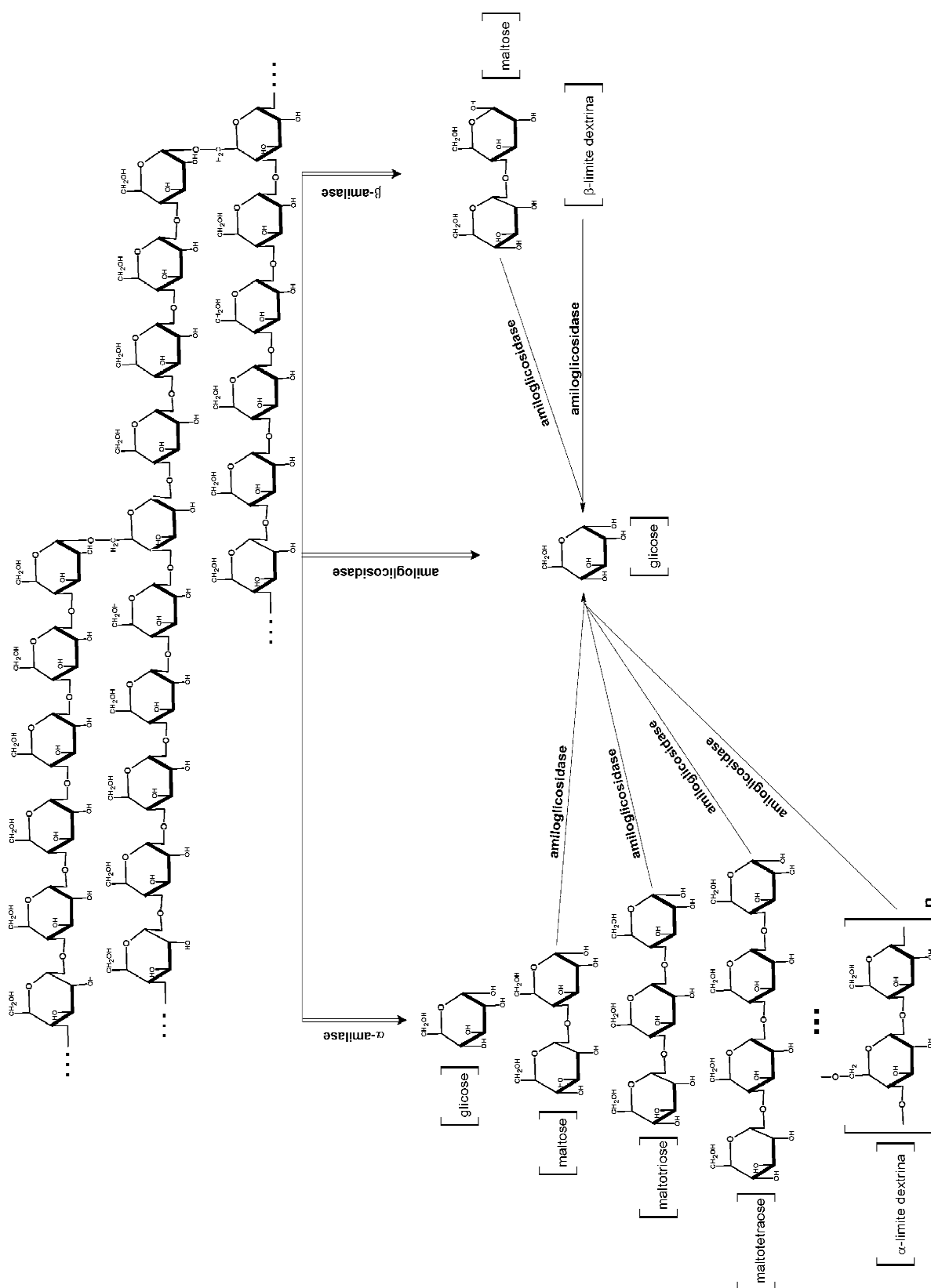


Figura 4- Esquema da degradação da molécula de amido pelas amilases.

O uso de amilases em processos industriais satisfaz as exigências das normas de ISO 14000 de baixo impacto ambiental, além da redução de gastos energéticos associados ao aumento da qualidade do produto (AZEMA et. al., 1995).

As amilases atuam sobre manchas que contém amido como molhos, frutas, chocolate e outras. O amido contido nesses materiais usualmente atua como uma cola que retém, inclusive, manchas de origens protéicas e lipídicas. Amilases comercializadas atualmente são produzidas por *Bacillus licheniformis* e *Bacillus amyloliquefaciens* por fermentação submersa. Essas enzimas hidrolisam amido transformando-o em oligômeros de cadeia curta (liquefação) que são solúveis em água. Como outras enzimas usadas em detergentes, possuem resistência moderada a pH alcalino e atuam em temperaturas elevadas. Cada aplicação requer uma peculiaridade quanto à especificidade, estabilidade, temperatura e pH. Dessa forma, métodos de *screening* para microrganismos com atividade amilolítica poderiam facilitar a descoberta de novas amilases para diferentes propósitos.

Recentemente, manipulações genéticas, com técnicas de mutação clássica e DNA recombinante, são realizadas no intuito de aumentar a capacidade produtiva dos microrganismos (SATO et. al, 2005).

De maneira geral, as pesquisas são focadas no intuito de se produzir satisfatoriamente a amilase a partir de microrganismos por meio de estudos de atividade enzimática, que indica o potencial amilolítico da enzima. No estudo da capacidade de degradação do amido por meio de microrganismos, o que se verifica, em suma, é o poder diastásico do complexo de enzimas que atua na degradação do amido.

MOREIRA et. al. (1999), EFFIO et. al. (2000), FIGUEIRA et. al. (2000), ALVES et. al. (2002), CORDEIRO et. al. (2002) e SANTOS et. al. (2003) estudaram a capacidade de alguns microrganismos, entre fungos e bactérias, de produzir amilases.

WANDERLEY et. al. (2004) isolaram uma linhagem de *Cryptococcus flavus* de frutas brasileiras que apresentou maior produção de α -amilase após 24 h de fermentação a 25 °C em meio de cultura contendo amido. A enzima apresentou atividade ótima em pH 5,5 e 50 °C. a enzima reteve 90 % e 60 % da atividade inicial após tratamento térmico a 50 °C e 60 °C respectivamente durante 60 minutos em pH 5,5.

STAMFORD et. al. (1998) trabalhando com microrganismos isolados do jacatupé (*Pachyrhizus erosus* L. Urban) obtiveram Índice Enzimático de Atividade (IEA) amilolítica em *Aspergillus oryzae* NRLL2022, *Norcardiopsis* sp., *Bacillus* sp. e *Arpergillus* sp. de 5,6; 4,4; 3,6; e 2,0 respectivamente, enquanto *Pithomyces* sp., *Rhizopus* sp., *Staphylococcus* sp., *Fusarium* sp. e *Trichoderma* sp não apresentara atividade amilolítica.

CORDEIRO et. al. (2002) observaram que α -amilase produzida por *Bacillus* sp. em pH 7,0 a 55 °C sob agitação de 150 rpm alcança atividade de 57 U/mL depois de 48 h de fermentação. Observaram também que o pH ótimo de atividade foi de 7,5. Atividades enzimáticas em pH 10,0 e 5,5 apresentaram valores 73 % e 55 % menores que aqueles em pH 7,5 respectivamente. A temperatura ótima para a atividade da enzima foi de 70 °C.

SANTOS e MARTINS (2003) aferiram que *Bacillus* sp. crescido em pH 7,0 em meio contendo 1 % em massa de amido solúvel como fonte de carbono produz α -amilase entre 18 e 48 h de fermentação, ou seja, também na fase logarítmica de crescimento. Ainda observaram que um aumento na concentração de amido no meio não favorece o aumento da atividade enzimática.

FIGUEIRA e HIROOKA (2000) utilizaram *F. moniliforme* 113F para produzir amilase e verificaram que um meio preparado com gérmen de milho beneficia o crescimento do microrganismo em detrimento do meio preparado com milho desgerminado e desengordurado. A maior atividade amilolítica (42,32 U/mL) foi alcançada quando o meio de crescimento foi composto de milho imaturo com milho maduro como fontes de carbono depois do décimo dia de fermentação.

2.3. Celulose e Celulases

A Celulose

A celulose merece um destaque especial entre os materiais carboníferos utilizados industrialmente por duas razões: primeiro porque pertence a uma classe de produtos naturais e depois, se utilizados de forma consciente, se transforma numa fonte inesgotável, pois é regularmente regenerado pela natureza em curto espaço de tempo.

As fontes primárias de celulose são as plantações de algodão e florestas. O acervo arbóreo das florestas vem sofrendo agressões significativas de modo a gerar um desequilíbrio ecológico considerável devido ao comércio ilegal de lenha, causador dos processos de lixiviação do solo e posterior insuficiência reprodutiva.

Segundo SANDERMAN et. al. (1973) uma árvore é capaz de produzir, em média, 13,7 g de celulose diariamente. Se as moléculas de celulose produzidas diariamente forem alinhadas, resultariam em uma fila de $2,62 \times 10^{10}$ Km de comprimento ou 175 vezes a distância da Terra ao sol.

A cada ano a fotossíntese converte mais de 100 bilhões de toneladas de gás carbônico e água em celulose e outros produtos vegetais.

Para isolamento da celulose a partir da madeira para aplicação industrial, a matéria-prima sofre maceração. Neste tratamento, outros componentes da madeira também são retirados como a lignina e a hemicelulose. Em muitos casos, a polpa da madeira manufaturada é constituída de cerca de 50% de líquidos que devem ser retirados para a produção da celulose comercial. Os líquidos retirados são, geralmente, utilizados como combustível na produção de vapor e força elétrica. Os materiais inorgânicos oriundos do despulpamento (sódio, magnésio, amônio e dióxido de enxofre) são simultaneamente recuperados. Esse processo de recuperação tem diminuído significativamente a degradação ambiental.

Tanto a lignina quanto a celulose são biodegradáveis. Produtos da celulose como o papel e o tecido celulósico são decompostos facilmente e transformados em húmus.

Assim, o grande problema de degradação do meio ambiente não é necessariamente causado pela celulose ou lignina, mas pelos produtos químicos utilizados na formação de derivados celulósicos.

A celulose não pode ser usada pela maioria dos animais como fonte de energia porque lhes falta uma enzima que hidrolise as ligações $\beta(1-4)$. Os únicos vertebrados que conseguem utilizar a celulose como alimento são os bovinos e outros ruminantes (ovelhas, cabras, camelos, girafas). O estômago extra desses animais (rúmen) contém protistas e bactérias que secretam celulase.

Estrutura Molecular da Celulose

Como a amilose e as cadeias principais da amilopectina e do glicogênio, a molécula de celulose é um homopolissacarídeo linear e não-ramificado, de 10 a 15 mil unidades de D-glicose.

Todavia, há uma diferença significativa na molécula de celulose, que tem a configuração β , enquanto na amilose, na amilopectina e no glicogênio a glicose está disposta na configuração α . As unidades de glicose na celulose estão unidas por ligações glicosídicas do tipo $\beta(1-4)$. Essa diferença confere à celulose e à amilose estruturas tridimensionais e propriedades físicas muito diferentes entre si.

Os polímeros de β -D-glicose, como a celulose, podem ser representados por uma série de anéis piranosídicos rígidos conectados por um átomo de oxigênio que faz ponte entre dois átomos de carbono (ligação glicosídica). Existe rotação livre para a ligação C-O que liga as duas unidades. A conformação mais estável para o polímero é aquela na qual a “cadeira” é rodada 180° em relação às subunidades vizinhas, formando uma cadeia reta e estendida. Com várias cadeias estendidas lado a lado, uma rede estabilizadora de

ligações de hidrogênio inter e intracadeias produz fibras supramoleculares retas, estáveis e de grande resistência à tensão (Figura 5).

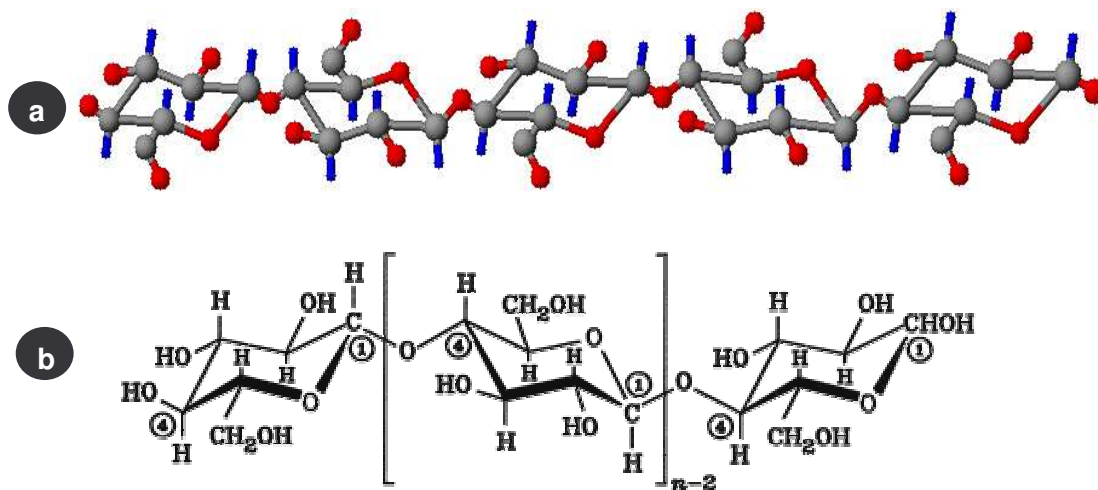


Figura 5- Representação da molécula de celulose: a) estrutura tridimensional da molécula; b) estrutura convencional com destaque para as posições das ligações glicosídicas $\beta(1-4)$.

A celulose é, portanto, um β -1,4-poliacetal isostático de celobiose (4-O- β -glicopiranosil-D-glicose). Por esta razão a celulose também pode ser considerada como um poliacetal de glicose sindiostático.

A fórmula elementar conhecida por PAYEN (1842) pode ser descrita como $C_{44,44\%}H_{6,2\%}O_{49,4\%}$. A massa molecular da glicose unida á molécula de celulose é 162. A massa molecular da celulose (M) pode ser descrita, então, segundo a equação 1.

$$M = m_0P + 18 \approx 162P \quad (1)$$

em que:

M : massa molecular média da celulose;

m_0 : massa molecular da glicose;

P : número de monômeros de glicose interligados na molécula de celulose.

O número 18 refere-se à molécula de água que continua na porção terminal da molécula de celulose.

HAWORTH et. al. (1969) observaram ligações covalentes tanto na molécula de glicose quanto nas ligações que as uniam enquanto STAUDINGER et. al. (1953) encontraram a prova final para a natureza macromolecular da molécula de celulose.

O anel glicopiranosídico possui quatro moléculas de carbono numa conformação em corrente. A formação em cadeira em comparação com a conformação em tabuleiro (ou barco) possui entalpia em torno de 20,05 KJ/mol.

Nessa conformação, os três grupos hidroxila são posicionados no plano do anel enquanto os átomos de hidrogênio estão em posição vertical (Figura 5). Isso representa, contudo, apenas um ponto de vista que permite dizer que existe alguma conformação na molécula de celulose.

Anomalias estruturais

Como qualquer polímero natural, a celulose contém quantidades pequenas de outros constituintes além da glicose, que representa cerca de 99 %. Estes constituintes podem ser parcialmente produzidos durante a biossíntese da celulose, tal como os complexos da lignina-celulose. Por razões morfológicas, mudanças químicas ocorrem preferivelmente nas regiões acessíveis interligadas entre as fibras elementares ou suas agregações. A existência das ligações fracas é dificilmente determinada. Na hidrólise ácida homogênea, todos os anéis glicosídicos quebram numa mesma taxa.

A celulose sempre contém grupos carboxila: na madeira, um -COOH a cada 100; em unidade de anidroglicose (AHG), 1000; em algodão, um grupo -COOH por 100-500 AHG.

Tamanho da molécula

O tamanho da molécula de um polímero pode ser definido pela massa molecular média ou seu grau de polimerização por meio da equação 2.

$$M = Pm_0 \quad (2)$$

em que:

M : massa molecular média da celulose;

m_0 : massa molecular da glicose;

P : número de monômeros de glicose interligados na molécula de celulose.

Pela investigação de determinadas propriedades físicas da celulose ou de soluções derivadas da celulose polihomóloga, o grau médio de polimerização pode ser determinado. A Tabela 2 lista o grau médio de polimerização de moléculas de celulose de várias origens.

Tabela 2 - Grau de polimerização de moléculas de celulose de várias origens.

Tipo de celulose	P
Algodão cru	7000 a 14000
Algodão purificado	300 a 1500
Linho	8000
Rami (tipo de planta)	6500
α -celulose (isolada de fibras de madeira)	800 a 1100
Abeto despulpado	3300
Faia despulpada	3050
Aspen	2500
Celulose bacteriana	2700
Celulose de <i>acetobacter</i>	600

Para a investigação do grau de polimerização das moléculas, podem ser utilizadas algumas soluções como solução de celulose em hidróxido de cobre II tetramônio (reagente de Scheitzer, Cuoxam), hidróxido de cobre II etilenodiamínico (Cuen), soluções alcalinas de etilenodiamino complexadas com cádmio e níquel.

Soluções de trinitrato de celulose (TNC) ou tricarbanilato de celulose (TCC) em solventes apropriados também são utilizados em estudos semelhantes (ver Tabela 3 para mais detalhes).

Tabela 3 - Valores das constantes cinéticas α , K_m e K_p . Concentração em g/L.

Sistema solvente		T (°C)	α	$K_m \times 10^5$	$K_p \times 10^3$
Celulose	Cuoxam	20	0,9	5,54	5,40
Celulose	Cuen	25	0,9	12,5	11,07
Celulose	Cadoxen	20	1,0	3,14	5,09
Celulose	Tartarato de sódio e ferro	20	1,0	4,08	6,61
TNC	Acetona	25	0,93	7,1	8,06
TNC	Acetato de butila	25	1,0	2,8	4,54
TNC	Acetato de etila	25	0,76	37,1	60,10
TNC	Etileno cloridrina	25	0,83	15,5	10,57
TCC	Acetona	25	0,91	143	146,60
TCC	Dioxano	25	0,97	81,3	113,10

Estudos de “Light scattering” realizados em soluções diluídas de celulose ou derivados de celulose podem fornecer a massa molecular média ou o correspondente grau médio de polimerização.

Estrutura Secundária

Em solução, as moléculas de celulose se encontram em forma de um novelo largamente expandido. Ainda, moléculas solvatadas e isoladas de celulose ou derivados de celulose possuem, geralmente, partículas de gel de extensa cadeia conhecida como micelas.

Na celulose sólida, regiões cristalinas se alternam com regiões amorfas. A celulose possui polimorfismo, ou seja, dependendo da origem ou das condições de isolamento ou conversão, a molécula pode adquirir uma conformação de cristais

reticulados. A celulose nativa mostra essa estrutura reticulada denominada de celulose I. Cada pilha da unidade molecular abriga duas moléculas arranjadas da celulose. O retículo de celulose I é do tipo esfenóico monocíclico. A Figura 6 mostra um esquema da modificação da pilha de moléculas das celulosas I e II.

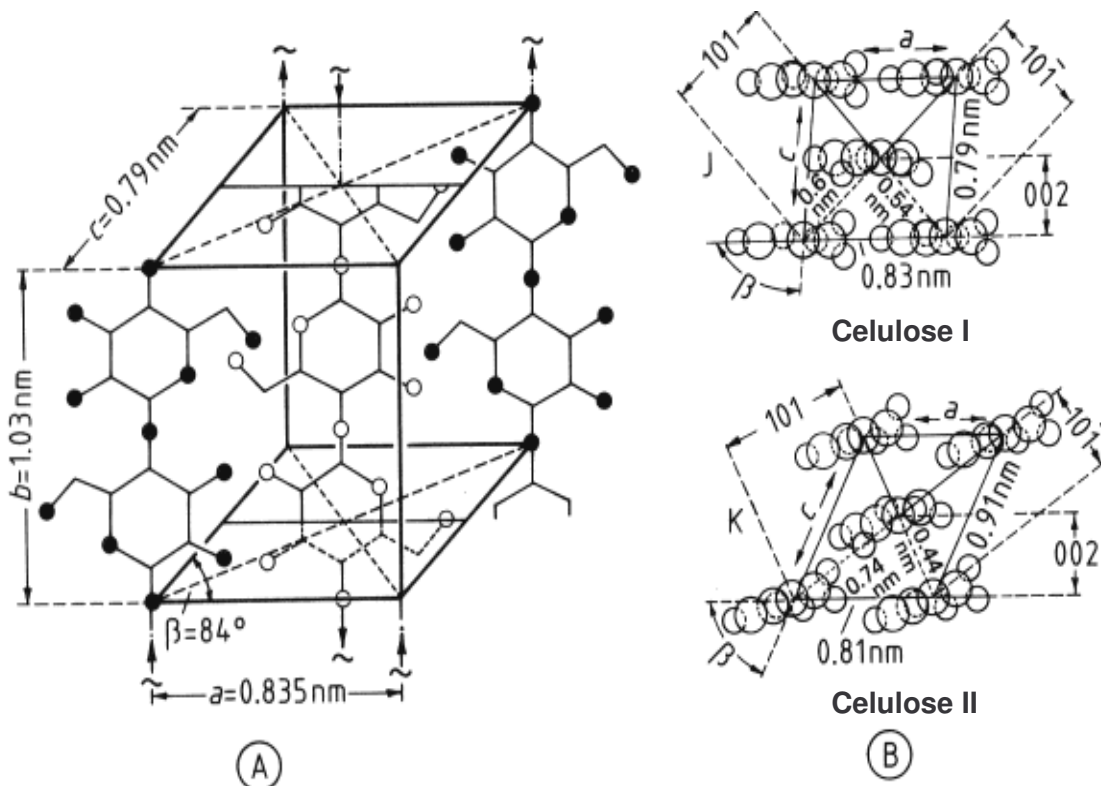


Figura 6- A) pilha do retículo cristalino de celulose I; B) corte transversal sob comparação entre a celulose I (nativa) e a celulose II (mercerizada). Fonte: <http://www.av.fh-koeln.de>

A estrutura básica elementar das fibras de celulose é denominada fibrila elementar. Estas microestruturas podem ser visualizadas por meio de microscopia eletrônica tal qual ilustrado na Figura 7.

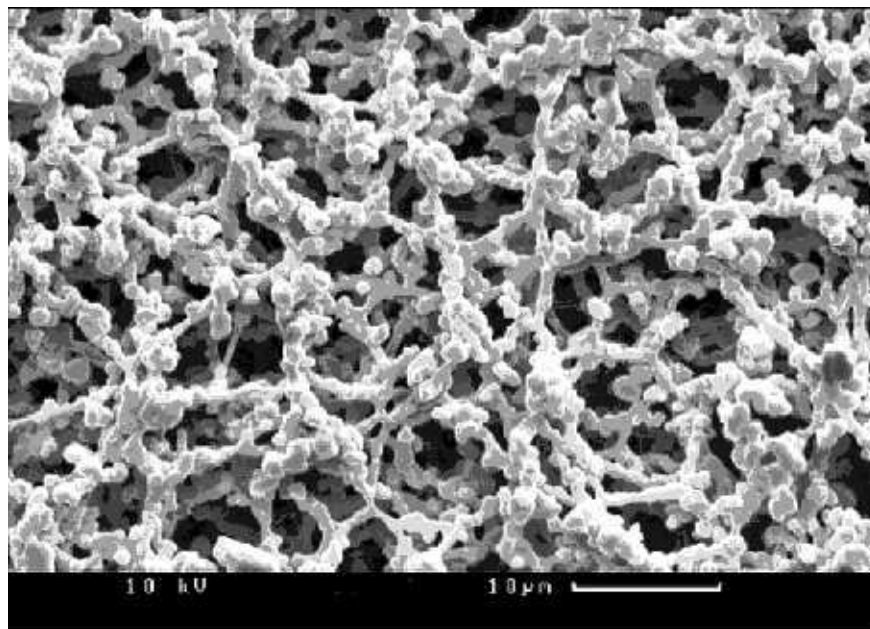


Figura 7 - Micrografia eletrônica das fibrilas elementares da fibra de celulose natural.

Propriedades Físicas da Celulose

A celulose é relativamente higroscópica. Uma vez em condições atmosféricas normais (20 °C e 60% de umidade relativa), absorve cerca de 8 a 14% de água (maiores detalhes na Tabela 4). Contudo, a molécula de celulose é insolúvel em água ou ácidos diluídos. Em soluções de ácidos concentrados, a celulose pode sofrer severa degradação. Soluções cáusticas causam extensivo crescimento e dissolução da porção de baixa massa molecular ($M \leq 200$).

Tabela 4 - Crescimento mássico de moléculas de celulose de distintas origens.

Tipo de celulose	Crescimento (%)
Algodão	18
Viscose (filamento contínuo)	74
Seda real tratada com cobre e amônio	86
Celulose triacetato	10
Celulose tripropionato	2,5
Celulose tributirato	1,8
Celulose trivalerato	1,6
Celulose triestearato	1,0

A celulose não sofre fusão. A decomposição térmica tem início sob temperaturas próximas de 180 °C. A combustão se dá em temperaturas iguais ou superiores a 290 °C. Em presença de cloro-gás e iodeto de zinco, a celulose cristalina adquire cor violeta ou azul quando tratada com ácido floroglucinol-hidroclórico. Caso a amostra de celulose contenha lignina, há alteração da cor para vermelho.

Como dados adicionais, a celulose possui densidade de 1,52 a 1,59 g/cm³; índice de refração de 1,54 para fibras perpendiculares e 1,62 para fibras paralelas; constante dielétrica de 2,2 a 7,2 (a 50 Hz), altamente dependente da umidade do meio; resistência ao isolamento de 10¹⁴ a 10¹⁷ W.cm, altamente dependente das condições de umidade do meio; resistência elétrica de 500 KV/cm; calor de combustão, 17,46 J/g; calor de cristalização, 18,7 a 21,8 KJ/mol de glicose; calor específico, 1,00 a 1,21 J/g.K; coeficiente de condutividade térmica: 0,255 KJ/m.h.K (para fibras soltas), 0,920 KJ/m.h.K (para fibras comprimidas); superfície específica interna, 10 a 200 m²/g.

Propriedades Químicas da Celulose

A reatividade química da celulose é determinada em grande parte pela estrutura molecular em estado sólido. Muitas das reações naturais que ocorrem com a celulose são heterogêneas. Algumas reações se iniciam a partir das fibras menos ordenadas na superfície das fibrilas elementares ou de suas agregações (reações topoquímicas).

Tecnologia da Celulase

O conjunto de enzimas envolvidas na degradação da celulose é denominado **Complexo Celulase**. A maioria dos estudos do complexo celulase refere-se a enzimas microbianas devido ao potencial de converter material celulósico insolúvel em glicose.

O Complexo Celulase, oriundo de microrganismos, animais e plantas, é formado por C1-celulase, C2-celobiase e exocelulase.

As enzimas do Complexo Celulase podem ser divididas em:

1. Endo- β (1-4) glucanase ou β (1-4) D glucano 4-glucanohidrolase ou Cx celulase ou CMCase (E.C.3.2.1.4): hidrolisa ligações β (1-4) ao acaso dentro da cadeia de celulose liberando glicose, celobiose e celodextrinas. Atua na região amorfa. A degradação da celulose insolúvel ou microcristalina até celulose solúvel ainda é pouco entendida. Considera-se que a endo- β (1-4) glucanase modifica a parte amorfa da celulose e produz celodextrinas de variadas massas moleculares. Ocorre redução rápida da viscosidade e aumento do poder redutor.
2. Exo- β (1-4) glucanase ou Avicelase ou exo glucana-4-glucanohidrolase ou C1 celulase (E.C.3.2.1.91): hidrolisa as ligações glicosídicas da celulose a partir da extremidade não redutora liberando celobiose.
3. Celobiase ou β (1-4) glicosidase: hidrolisa as ligações do tipo β (1-4) (celobiose, trealose, gentiobiose) e libera glicose.
4. Exo- β (1-4) D glucana glicohidrolase: hidrolisa as ligações β (1-4) glicosídicas de celodextrinas e libera glicose. A atividade diminui com a diminuição da cadeia do substrato.

A ação da celulase em determinado substrato depende, preponderantemente, da origem do substrato e da composição ou, ainda, de pré-tratamentos químicos ou físicos em ação sinérgica com outras classes de enzimas como xilanases, pectinases, peroxidases, lactases, fenoloxidasas, dentre outros.

A celulose nativa é mais facilmente hidrolisada pela ação combinada de endo e exo- β (1-4) glucanases que pela ação individual dessas enzimas.

Bactérias são reconhecidamente produtores de endoglucanases intra e extracelulares enquanto fungos produzem endoglucanases predominantemente extracelulares.

À medida que as endo e exoglucanases agem sobre o substrato, os produtos formados inibem a ação das enzimas (LADISCH et. al., 1983). Endoglucanases também têm sido testadas como catalisadores de reações de transglicosilação (OKADA et. al., 1975).

Para a análise do potencial de hidrólise de um sistema de celulases, a celulose cristalina insolúvel deve ser a fonte de carboidrato escolhida. Avicel (celulose microcristalina) é um substrato apropriado desde que seja de alto grau de pureza e de fácil obtenção. Contudo, não é um substrato uniforme, pois contém traços de xilana, partes amorfas (acima de 30 %) e variação de granulometria (diâmetros variando de 5 a 100 μ m). De qualquer forma, a superfície externa exposta à ação da enzima fica submetida a uma grande variabilidade de formas e tamanhos o que impede a atuação eficaz da enzima. As regiões amorfas dos materiais celulósicos são mais suscetíveis à atuação da enzima em comparação com as partes cristalinas (BERGMEYER, 1984).

Devido à falta de homogeneidade do substrato e à variabilidade do complexo celulase, a cinética enzimática se torna complexa. Assim, torna-se necessária uma preparação do material a ser fermentado de modo a torná-lo uniforme. Dessa forma, pode

ser determinada uma correlação linear para uma posterior análise de atividade enzimática.

Os passos do mecanismo de hidrólise da celulose ainda não são bem entendidos. Todavia, sabe-se que para a conversão da celulose microcristalina, são necessários pelo menos dois tipos de enzimas: endo e exoglucanases (Figura 8).

Cinéticas baseadas em reações de primeira ordem ou de Michaelis-Menten são geralmente equivocadas (LEE et. al., 1982; BUCHHOLZ et. al., 1981).

Então, para a obtenção de dados analíticos é necessário escolher uma aproximação empírica que permita uma comparação de preparações de celulasas sob condições de reação bem definidas. A escolha destas condições sempre representa um conflito como, por exemplo, uma análise rápida e fácil em contraposição a um alto grau de conversão.

As condições de teste devem ser idênticas para fins comparativos: pH ótimo, temperatura, concentração do substrato, nível de conversão, concentração de produtos (glicose e celobiose, dentre outros). O tempo de reação não deve exceder muitas horas para que não haja inativação.

Caso a atividade de β -glucosidase seja insuficiente em meio ao complexo celulase, esta enzima deve ser adicionada para que haja conversão da celobiose a glicose, pois a inibição enzimática provocada pela celobiose é maior que aquela provocada pela glicose (BERGMEYER, 1984).

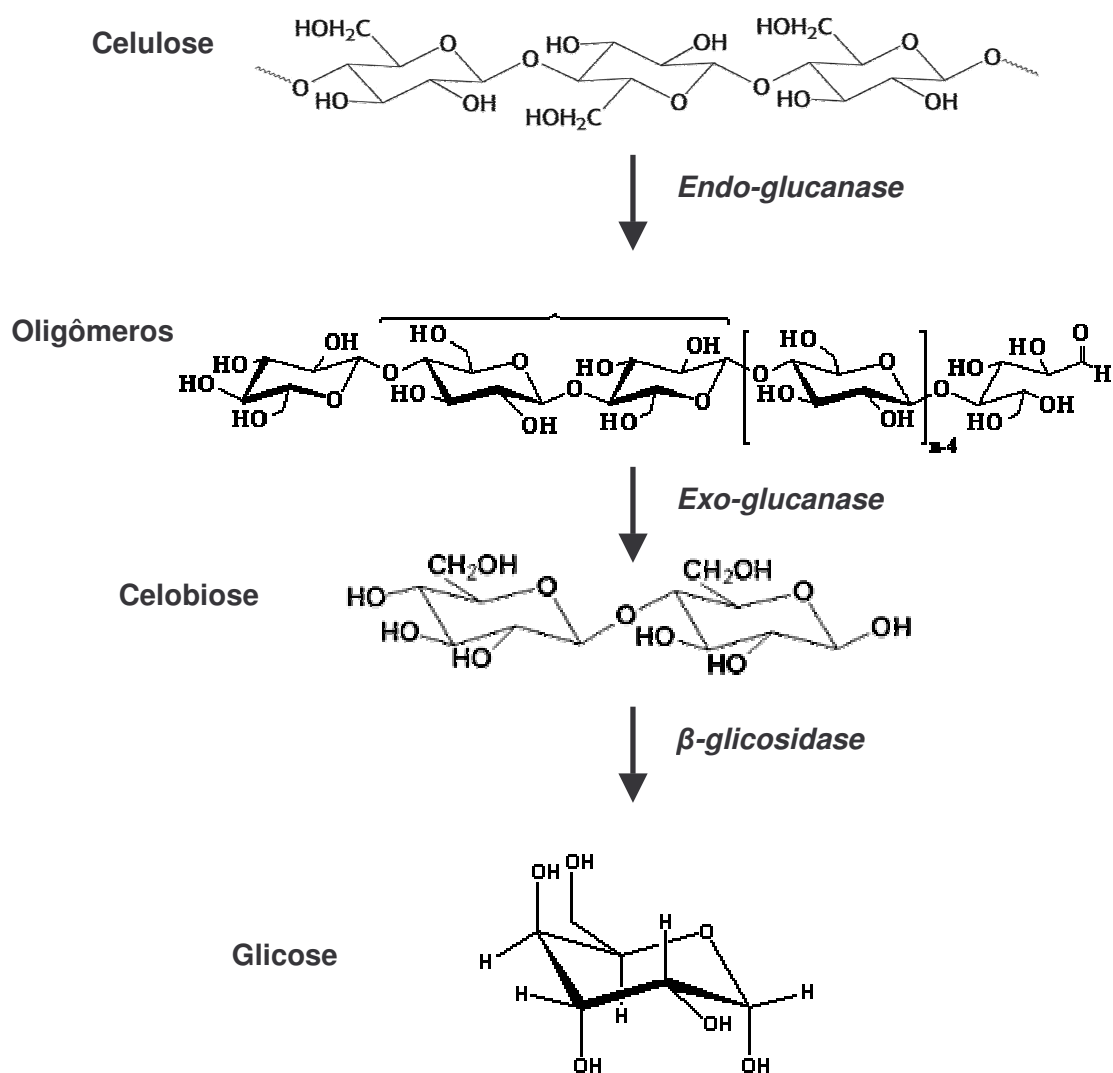


Figura 8- Mecanismo de ação das celulasas sobre cadeias de celulose. A celulose original possui tanto a parte cristalina quanto a parte amorfa.

As Hemicelulases

As hemicelulases ou pentosanases de microrganismos e algumas plantas superiores hidrolisam as xilanas, arabanos e arabinoxilanas até xilose, arabinose e oligossacarídeos de baixa massa molecular. A hemicelulose é composta por polímeros de xilose (xilanas), de arabinose (arabanos) com pequena quantidade de outras pentoses ou hexoses que são encontradas em plantas superiores.

As preparações de celulases comerciais geralmente contêm hemicelulases. Essas preparações são obtidas em grande parte a partir de linhagens de *Trichoderma reesei* e *Aspergillus niger*.

Dentre as variadas aplicações industriais das celulases comerciais, destacam-se a degradação da celulose, obtenção de agar de algas marinhas, redução da viscosidade e aumento da extração de produtos vegetais e auxílio na digestão em rações animais.

Importantes características de transformação são atribuídas à utilização das celulases nas indústrias. A saber:

- Aumenta a palatabilidade e digestibilidade de produtos a base de grãos e vegetais;
- Sacarifica a celulose para posterior fermentação;
- Em conjunto com pectinases, clarifica, elimina a turbidez e aumenta a produtividade na extração de sucos;
- Auxilia na fermentação de açúcares componentes de massas e bebidas;
- Modifica a textura de produtos vegetais processados;
- Remoção de cascas de frutas e vegetais para preparação de purês;
- Tratamento de grãos de arroz para posterior fermentação no preparo de bebidas;

- Na indústria cervejeira, é empregada em conjunto com amilases e pectinases para maior aproveitamento dos cereais utilizados como fonte de carbono.

As celulasas comerciais apresentam, de um modo geral, uma atividade ótima na faixa de pH entre 4,5 e 6,0 sob temperatura de 60 °C e se comportam de modo estável em temperatura inferiores a 50 °C.

Comportamento Microbiano Frente à Produção da Celulase

Embora muitos fungos e bactérias degradem a celulose, os produtos devido ao crescimento microbiano em meios contendo este carboidrato são, de um modo geral, o gás carbônico e o metano. Apenas poucas cepas de fungos têm sido consideradas como grandes produtoras de enzimas capazes de degradar extensivamente a celulose insolúvel até açúcares solúveis. O rápido crescimento e decomposição da celulose ou a produção de altos níveis de enzima que degradem a celulose solúvel não é um critério adequado para a seleção de microrganismos que venham a ser usados como fonte de uma enzima extracelular estável ou que sirva de preparação para uso em sacarificação da celulose.

Segundo MANDELS et. al. (1976) a celulase produzida por *Pestalotiopsis westerdijkii* é considerada incompleta, pois contém altos níveis de endo- β -glucanases e celobiases, mas é carente em atividade de C₁. Por outro lado, a celulase produzida por *Trichoderma viride* é considerada completa, pois a celulose insolúvel é rapidamente hidrolisada, seguida por uma hidrólise mais lenta das porções mais resistentes até a total decomposição da celulose nativa.

A diferença entre a capacidade de degradação da celulose pode ser comparada quando as enzimas preparadas por centrifugação são utilizadas na degradação de papel de filtro. Não há medida absoluta que possa ser avaliada para uma única enzima agindo

sobre um substrato solúvel. Quanto mais resistente o substrato e maior o tempo de exposição da enzima, maior a diferença entre a capacidade produtiva de celulasas completas e incompletas. Um estudo da capacidade produtiva de celulasas depende, contudo, da escolha do substrato, sua concentração e a extensão da conversão.

Experimentos com utilização de papel de filtro têm sido largamente utilizados por serem considerados simples e de fácil reprodutibilidade (OGAWA et. al., 1982; RAJOKA et. al., 1997; STAMFORD et. al., 1998; RAJOKA, 2004; KANG et. al., 2004; LEE et. al., 2005; WEI et. al., 2005; LAI t. al., 2005). Neste experimento, a sacarificação da celulose prediz a ação da enzima na conversão extensiva da celulose concentrada a partir de uma experiência razoavelmente curta baseada na conversão limitada de uma quantidade de substrato diminuída.

Considerações sobre a Produção da Celulase

Fungos, de um modo geral, são vigorosos produtores de ácidos em meios contendo carboidratos associados a NH_4^+ como fonte de nitrogênio. A taxa de produção de ácido é diretamente relacionada à taxa de consumo de carboidrato. O consumo de carboidrato faz com que o meio tenha o pH aumentado. Quando esgotado o carboidrato do meio, há formação de ácido e conseqüente queda de pH.

A celulase de origem fúngica é produzida quando o microrganismo é inoculado em meios de culturas que contenham celulose, sefarose (polissacarídeo bastante utilizado na produção de resinas para purificação de proteínas), lactose ou celobiose como fonte de carbono. A glicose, utilizada como fonte de carbono, não serve como indutora da produção de celulasas e, ainda, reprime fortemente a produção dessa enzima mesmo na presença de indutores (NISIZAWA et. al. 1972). A maior produtividade é obtida quando se utiliza a celulose na forma pura (cristalina) ou complexada.

A sefarose, apesar de ser boa indutora, faz com que os microrganismos produzam a celulase em níveis extremamente baixos, o que não justifica a utilização deste sacarídeo como indutor de quantidades apreciáveis da enzima, foco importante deste trabalho.

Segundo MENDELS et. al. (1969) e REESE et. al. (1971), a adição de Tween 80 e peptona ao meio de cultura, aumenta consideravelmente a produção de celulase.

Caso se utilize celobiose, glicose ou outro carboidrato de rápido consumo no meio de cultura que contenha celulose como principal fonte de carbono, o consumo desses açúcares é seguido de uma queda no pH do meio e de uma posterior queda na concentração da enzima.

A β -glicosidase é inativada quando o pH do meio que a contém está abaixo de 3,5. Para valores de pH abaixo de 3,0, há perda da celulase produzida (STENBERG, 1976).

A inativação ácida é irreversível. Se a celulose está presente no meio, as enzimas reaparecerão depois que a glicose seja consumida, desde que ainda haja celulose disponível.

De toda forma, se o pH do meio de cultura for controlado por volta de 5,0 durante o consumo dos açúcares, há boa produção da enzima (Tabela 5). Por outro lado, haverá similar produção de ácido e inativação enzimática caso haja acréscimo de celulose ao meio de cultura que contenha o microrganismo adaptado às condições de concentração da celulose original. A enzima já formada no meio hidrolisa rapidamente as porções de celulose adicionada, causando o mesmo efeito reportado ao pH e à glicose.

Quando a taxa de consumo de glicose sofre queda, o pH aumenta, o que pode levar a um acúmulo futuro de enzima. O sistema deve seguir uma tendência de feedback negativo sobre a produção das enzimas extracelulares. Esse mecanismo de controle ao agir na enzima já sintetizada não seria confundido com uma repressão glicolítica.

Tabela 5 - Efeitos da adição de glicose para a indução da produção de celulase com e sem controle de pH.

	Atividade da enzima				horas depois da adição de glicose
	pH não controlado		pH controlado em 5,0		
	0	22	0	22	
β-glicosidase	0,15	0	0,18	0,16	unidades por mL
Celulase	0,48	0,32	0,77	0,75	unidades por mL

Trichoderma viride QM9414 crescendo em fermentador de 10 L em 0,5 % de BW 200 com pH controlado acima de 4,0. Após o consumo da celulose, seguido do aumento do pH, 0,5 % de glicose foram adicionados e o pH controlado com valores acima de 5,0. Glicose foi rapidamente consumida. Com um novo aumento do pH, mais 0,5 % foram adicionados. O pH não foi mais controlado e caiu a 2,4. Então a glicose foi consumida mais lentamente. Fonte: MENDELS et. al. (1975).

Métodos de Determinação de Atividade de Celulases

Um número razoável de experimentos tem sido utilizado na determinação da atividade enzimática de celulases (CANEVASCINI et. al., 1981). Um procedimento muito comum é medir a taxa de formação de açúcares redutores durante a incubação de enzimas com substratos contendo celulose. De toda forma, como a reação não é estequiometricamente balanceada, é realizada uma reação de grupo aldeído dos açúcares com ácido dinitrosalicílico, ferricianeto ou reagente de Somogyi-Nelson (MILLER et. al., 1960; NELSON et. al., 1944; SOMOGYI, 1952; WOOD et. al., 1972). Ainda, há uma diversidade de açúcares oriundos da celulose, incluindo aqueles resultantes da ação de outras enzimas do complexo celulase. Por isso, esses experimentos não devem ser considerados como padrões de análises para atividade enzimática.

O método mais utilizado na determinação de atividade enzimática de celulases é o método do papel de filtro (FPase). Embora de fácil aplicação, este método está sujeito a algumas fontes de erro como, por exemplo, as supracitadas, diferentes graus de conversão e diferentes quantidades de produtos inibidores formados como celobiose e glicose com alto e baixo poder de inibição, respectivamente.

RAJOKA e MALIK (1996) trabalharam com *Cellulomonas biazotea* na produção de celulase e diferentes substratos e obtiveram maior atividade enzimática entre 64 e 72 h de

fermentação. A atividade de carboximetilcelulase (CMCase) foi maior em todos os substratos testados (avicel, CMC, α -celulose, celobiose, xilana e p-nitrofenil- β -D-glicopiranosídio) em comparação com atividade de FPase (atividade sobre papel de filtro) e β -glicosidase.

RAJOKA (2004) trabalhou com *Cellulomonas flavigena* NIAB 441 a 30 °C em pH 7,3 e observou que o crescimento em sacarídeos monoméricos ou diméricos, CMC e α -celulose favorecem a produção de celobiase e FPase por diminuírem a fase “lag” de crescimento em comparação com o crescimento em arabinose, xilose, glicose, galactose e frutose.

2.4 Gomas

A definição técnica corretamente aceita de goma é o material de origem vegetal ou microbiana que pode ser dissolvido ou dispersado em água fria ou quente para dar soluções viscosas ou dispersões.

O termo colóide hidrofílico é usado como sinônimo de goma. Originalmente, o termo goma foi provavelmente aplicado a exsudato natural de plantas e mais tarde se estendeu a materiais insolúveis em água, como chiclete e látex, bem como outros materiais insolúveis naquele solvente universal.

As gomas são polissacarídeos de alto peso molecular e, devido à sua afinidade pela água, desempenham papel importante como componente da maioria dos alimentos.

Podem ser classificadas em gomas naturais (aquelas encontradas na natureza), gomas modificadas ou semi-sintéticas (aquelas baseadas em modificações químicas de gomas naturais) e gomas sintéticas (aquelas preparadas por síntese química).

As gomas são utilizadas num grande número de aplicações específicas, abrangendo desde adesivos até agentes de aeração, porém as funções gerais das gomas podem ser resumidas em suas duas propriedades principais: geleificante e espessante.

Assim, devido às suas diferentes propriedades e funções, as gomas também são importantes constituintes de misturas de aditivos alimentares.

Hidrocolóides são polímeros de cadeia longa, de alto peso molecular, extraído de plantas marinhas, sementes, exudatos de árvores e de colágeno animal. Alguns são produzidos por síntese microbiana e outros por modificação de polissacarídeos naturais. Estes polímeros se dissolvem ou se dispersam em água para dar um espessamento ou efeito de aumento de viscosidade. As gomas também são usadas para efeitos

secundários incluindo estabilização de emulsão, suspensão de partículas, controle da cristalização, encapsulação e formação de filmes. Poucas gomas formam gel. A Administração de Medicamentos e Alimentos dos Estados Unidos, FDA – “Food and Drug Administration”, designa estes compostos como reconhecidos amplamente como seguros GRAS – “Generally Recognized as Safe”.

Os polissacarídeos são polímeros de condensação que geralmente contêm centenas de moléculas de monossacarídeos unidos por ligações glicosídicas tal qual o amido, que é uma mistura de dois polissacarídeos, a amilose e a amilopectina.

Os polissacarídeos de origem vegetal, por apresentarem cerca de três quartos do peso seco de plantas, podem ser obtidos a custo relativamente baixo. Contudo, a extração só é vantajosa caso a planta, ou parte dela, seja rica num determinado tipo de polissacarídeo.

São aplicados nas indústrias farmacêuticas, alimentícias e de cosméticos. É comumente encontrada em molhos para saladas, produtos cozidos, sobremesas congeladas, alimentos industrializados prontos para comer, comidas de conveniência, petiscos e comidas para animais, aumentando a ação de outros hidrocolóides, dando volume e modificando a textura.

Dentre os microrganismos produtores de gomas, existem os que produzem polissacarídeos intracelulares, como é o caso maioria dos polissacarídeos microbianos, e os que excretam o sistema enzimático sintetizador para o meio extracelular como é o caso dos microrganismos produtores de levanas e dextranas. Não só o mecanismo de biossíntese é totalmente diferente como os precursores também o são. Exopolissacarídeos microbianos podem ser alocados em quatro categorias (SUTHERLAND, 1993):

- (1) **Dextranas e levanas** – constituídos de unidades monoméricas homogêneas (homopolissacarídeos) e sintetizados por uma larga classe de bactérias, algumas espécies sendo capazes de produzir ambos os polímeros; pertencendo também a esta classe a “mutama”, um polissacarídeos insolúvel α -(1-3)-glicano elaborado por culturas de *Streptococcus mutans*;
- (2) **Outros homopolissacarídeos** que não dextranas e levanas;
- (3) **Heteropolissacarídeos** – constituídos de unidades monoméricas heterogêneas e de frequência **regular** na cadeia polimérica como, por exemplo, goma xantana;
- (4) **Heteropolissacarídeos** de estrutura **irregular**.

A sacarose é o substrato para a produção de dextranas. Na ausência de sacarose, não existe produção desta goma.

Na indústria açucareira, a dextrana é indicador de perdas na fabricação do açúcar. Neste caso, a dextrana pode ser oriunda da própria cana-de-açúcar ou de um provável contaminante microbiológico. No corte da cana-de-açúcar seguido de deterioração ocorre a contaminação por bactérias produtoras de dextrana a partir da sacarose disponível. Esta é, certamente, uma fonte rica para a seleção de microrganismos produtores de dextrana, tal qual exposto no trabalho elaborado por VIEIRA (2003).

Segundo WISHTLER (1993), gomas elaboradas por microrganismos selecionados, ou adaptados geneticamente, e cultivados em fonte de energia de baixo custo, como o melaço, podem ter seu custo reduzido. Vislumbra-se, também, a possibilidade de que gomas obtidas por fermentação venham a suprir muitas necessidades industriais e seu custo diminua com o aumento do volume de produção.

É de grande relevância a deflagração de importantes leveduras produtoras de gomas, principalmente dextranas, por disponibilizar tanto à indústria farmacêutica quanto de alimentos insumo produzido biossinteticamente sem efeito toxicológico e de extensa aplicabilidade. Há, sobretudo, uma extensa variedade de gomas microbianas com diferentes propriedades obtidas de linhagens já isoladas, mas várias outras estão por serem isoladas devido, principalmente, à rica biodiversidade brasileira ainda pouco explorada.

Goma Dextrana

A síntese de dextrana tem sido estudada desde 1874 por Scheibler, quando observou que havia um aumento da viscosidade do caldo de cana-de-açúcar e de beterraba provocada por um carboidrato dextro-rotatório com fórmula empírica $(C_6H_{10}O_5)_n$. Mais tarde, pesquisadores chegaram à conclusão de que a dextrana não é uma substância única e com propriedades específicas. Atualmente, dextrana é o nome dado a uma classe extensa de polissacarídeos extracelulares compostos exclusivamente de monômeros de α -D-glicopirranose interligadas, em sua maior parte, por ligações do tipo $\alpha(1-6)$ (BARKER et. al., 1983).

Dextranas são, portanto, moléculas de glicose unidas por ligações $\alpha(1-6)$ na cadeia principal e ligações $\alpha(1-4)$, $\alpha(1-3)$, e $\alpha(1-2)$ nas ramificações. Uma cadeia hipotética de dextrana está ilustrada na Figura 9.

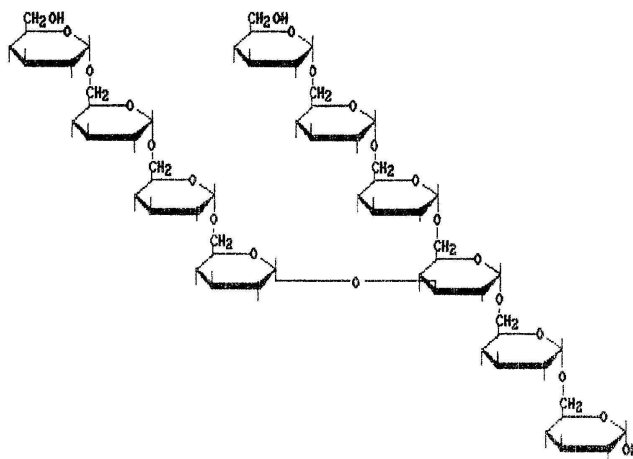


Figura 9– Ilustração da estrutura da dextrana.

A dextrana é um polissacarídeo de valor agregado relevante obtido a partir da sacarose por meio da enzima dextrana-sacarase. Este polissacarídeo possui alta massa molecular, variando de 100.000 a 10.000.000 daltons. São normalmente solúveis em água, insolúveis em álcool e altamente dextro-rotatórias, com rotações específicas de + 200° ou mais (KITCHEN, 1988).

Como descrito por RODRIGUES (2003), a aplicação da dextrana como coadjuvante de tecnologia depende de sua massa molar. Este insumo pode ser aplicado nas áreas farmacêutica, química, petroquímica e de alimentos. A produção de dextrana em escala industrial é realizada através da fermentação promovida pela bactéria não patogênica *Leuconostoc mesenteroides*, sendo a síntese enzimática de dextrana um processo viável devido à alta estabilidade da enzima nas condições ótimas de síntese.

A dextrana é produzida nos países desenvolvidos com o intuito de servir de matéria-prima de produtos clínicos. Estima-se uma produção anual de, aproximadamente, 500 toneladas para a dextrana clínica (DE BELDER, 1993).

O processo de produção da goma dextrana é em batelada alimentada com utilização da bactéria *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512 ou B-512F. A precipitação ocorre com adição de etanol ou metanol. Em seguida há hidrólise ácida até obtenção de uma massa molecular apropriada à função a ser aplicada com posterior isolamento por fracionamento.

O processo enzimático em detrimento do processo fermentativo apresenta vantagens tais quais maiores rendimentos, maior facilidade de purificação do produto final e facilidade no controle do processo.

Todavia, apesar das vantagens apresentadas, o processo enzimático é de alto custo e inviabiliza a utilização deste processo em larga escala.

A grande vantagem da utilização de dextrana é que ela é biodegradável em humanos, bem tolerada, não é tóxica e não provoca reações no organismo. Sua utilização no campo médico-farmacêutico eclode a aplicação em procedimentos que envolvem transfusão de sangue e sua funcionalidade tem sido objeto de vários estudos devido ao fato que a escolha de grupos apropriados podem atrasar a coagulação do plasma. Outra utilização é o emprego na construção de géis transportadores de drogas.

Funcionalidade tecnológica da dextrana

A massa molecular da dextrana obtida, o tipo de estrutura e a hidrossolubilidade são fatores primordiais para estabelecer sua aplicação.

Muitas delas têm vasta utilidade na indústria, tal qual a dextrana nativa, que pode ser utilizada na recuperação secundária do petróleo, como filme de proteção de sementes, processos de galvanização de metais, em suturas cirúrgicas e na indústria de alimentos como estabilizantes e espessantes de xaropes (BERKER et. al. 1983).

Dextranas de massa molecular média são mais utilizadas nas indústrias química e de alimentos. Na primeira, a dextrana é matéria-prima na fabricação de redes moleculares, que são cadeias de dextrana unidas por ligações cruzadas, utilizadas no empacotamento de colunas cromatográficas de exclusão molecular; na segunda, pode ser utilizada como inibidor de cristalização em sorvetes e espessante de doces e xaropes (SANTOS, 1996).

Para dextrana de baixa massa molecular, a demanda principal é para a indústria farmacêutica como expansor do plasma sanguíneo e facilitador do fluxo de sangue (ALSOP, 1983).

A dextrana de baixa massa molecular é completamente metabolizada pelo organismo e não apresenta qualquer efeito tóxico ou alergênico, o que não é conferido à dextrana de alta massa molecular ou com alto grau de ramificação (QUEIROZ, 1987).

Mais recentemente, a dextrana tem sido aplicada em operações que envolvem separações como o empacotamento de colunas cromatográficas; na indústria de cosméticos como agente espessante, hidratante e condicionante em produtos dermatológicos e de uso capilar; na indústria fotográfica em processos de fotocópia e exames diagnósticos in vivo (Magnetic Resonance Imaging – MRI).

Há, ainda, a utilização da dextrana em forma salina, como na forma de sulfato de sódio e dextrana, chamado de sulfato de dextrana (Figura 10a), que é um derivado polianiónico de alto grau de pureza e com aplicação na biologia molecular e no setor da saúde. Como propriedades, citam-se a grande hidrossolubilidade, biodegradabilidade, formador de soluções cristalinas, alta pureza e boa estabilidade, tem o aspecto do mucopolissacarídeo natural, como o sulfato de condroidina. Age como estabilizador de ingredientes naturais sensíveis e tem alto valor agregado (DEXTRAN DERIVATIVES, 2005).

O sulfato de dextrana 10 (Figura 10a) também é um derivado muito peculiar em sua utilização. Tem baixo peso molecular e serve para aplicação nos setores da biologia molecular e da saúde. Possui propriedades semelhantes ao sulfato de dextrana supracitado, divergindo apenas no grau de polimerização (DEXTRAN DERIVATIVES, 2005).

Outro importante derivado é o DEAE-dextrana (dietilaminoetil-dextrana) (Figura 10b), um composto policatiônico de alta pureza e microbiologicamente controlado, o que viabiliza sua utilização na manufatura de vacinas, terapia genética e estabilização de proteínas. DEAE-dextrana pode ser estocado por mais de três anos sob temperatura ambiente. Este composto é preparado a partir de uma fração de dextrana definida com peso molecular maior que 500.000 Daltons (DEXTRAN DERIVATIVES, 2005).

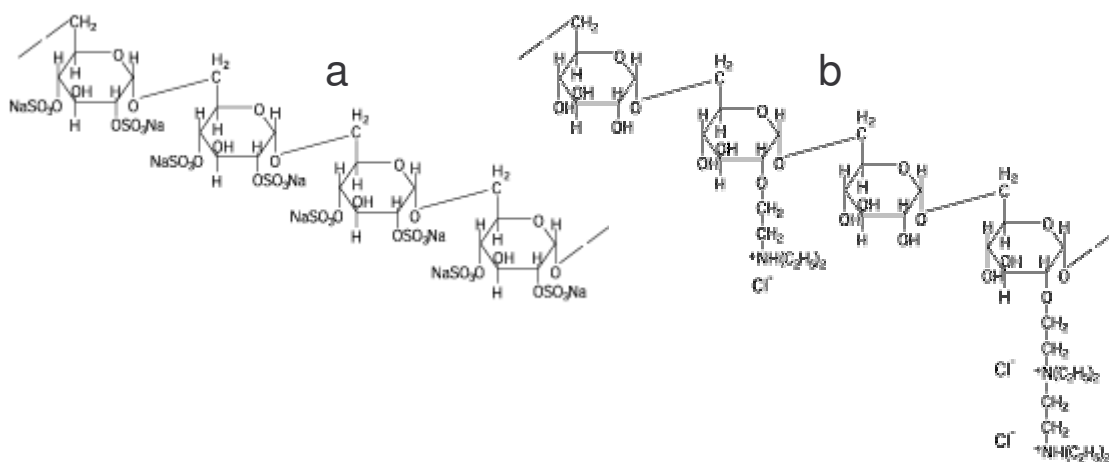


Figura 10 - Estruturas moleculares dos compostos: (a) sulfato de dextrana e (b) DEAE-dextrana (dietilaminoetil-dextrana).

Produção microbiológica de dextrana

De acordo com descrição de JEANES (1966), linhagens produtoras de dextrana já foram isoladas de muitas fontes relacionadas à produção de sacarose como caldos contaminados ou não, das folhagens de cana cortada e no solo. A maior parte das dextranas conhecidas é sintetizada a partir da sacarose pela bactéria não patogênica *Leuconostoc mesenteroides* e *Leuconostoc dextranicum*. O gênero *Leuconostoc* pertence à família *Lactobacillaceae*. Dextranas também são produzidas a partir de sacarose por outras espécies de outros gêneros da família *Lactobacillaceae* como *Streptococcus* e *Lactobacillus*.

Contudo, a produção de dextrana não é associada a leveduras por não existir nestas uma produtividade que seja comercialmente favorável. Todavia, como dito, não se conhece a extensão da microbiota brasileira, no que se revela o grande potencial de uma cepa de levedura produzir satisfatoriamente esse polissacarídeo.

Goma Xantana

A xantana (Figura 11) é um heteropolissacarídeo produzido industrialmente pela bactéria *Xanthomonas campestris*. É um dos biopolímeros mais importantes do ponto de vista comercial. A produção anual é de 30.000 toneladas, correspondendo a um montante pecuniário de 408 milhões de dólares (KALOGIANNIS et al., 2003).

O processo de produção utilizado comercialmente é em batelada simples com duração de aproximadamente 80 h. Glicose ou amido, combinados com ácidos e

tratamento enzimático, são utilizados como substrato. Sacarose e ácidos do soro de leite e queijo também são efetivos na produção deste polissacarídeo.

A modificação do comportamento reológico do meio fermentado causa sérios problemas com relação à mistura, transferência de calor e fornecimento de oxigênio. Dessa forma, há efeito negativo com relação à quantidade máxima de goma produzida bem como à qualidade do produto final (WECKER et al., 1991).

Para a resolução deste problema, várias técnicas têm sido adotadas, tal como a produção de xantana por células imobilizadas, que não produziram resultados satisfatórios (LEBRUN et al., 1994; ROBINSON et al., 1998).

JU et al. (1993) realizaram fermentação com a bactéria *Xanthomonas campestris* em emulsões e dispersões de água em óleo, o que resultou em grande concentração de xantana na fase aquosa, mas essa produção foi muito menor quando o volume total da cultura fluida foi levado em consideração.

Resultados mais significativos foram alcançados por GALINDO (1994) com a utilização de fermentadores equipados com sistemas impulsores melhorados e por WERNEAU (1981) com fermentação em batelada alimentada.

YANG et al. (1996) utilizaram um reator centrífugo com leite empacotado em que obtiveram uma produção de xantana duas vezes maior quando comparada com a fermentação em batelada convencional.

STREDANSKY et al. (1998), trabalhando com produção de xantana por via fermentativa em estado sólido, obtiveram resultados que revelam a dependência de uma fonte de nitrogênio para que sejam alcançados valores de produção de xantana significativos. Neste trabalho, a maior produtividade foi obtida quando utilizado glutamato monossódico na concentração de 4 g/L com produção aproximada de xantana de 45 g/L.

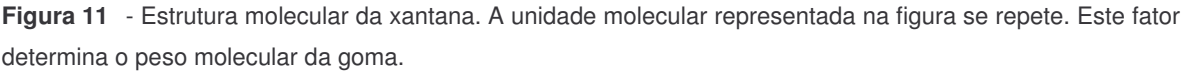
Outras fontes de nitrogênio importantes foram o citrato de amônia e a peptona de grãos de soja.

Devido à sua estrutura única (Figura 11), a goma xantana possui propriedades pseudoplásticas, alta viscosidade e solubilidade, boa estabilidade numa grande faixa de pH e temperatura além de ser compatível com vários sais, ingredientes alimentares e outros polissacarídeos usados como agente espessante (SUTHERLAND, 1998).

Tais propriedades são determinadas pela sua composição química, arranjos e ligações moleculares, peso e distribuição molecular. Na produção deste biopolímero, a cinética e a eficiência podem ser afetadas pela alteração do peso molecular, incorrendo numa variação das condições de crescimento do microrganismo no meio (PAPAGIANNI et al., 2001).

Essas propriedades fazem da goma xantana um ingrediente bastante difundido na indústria de alimentos, principalmente atuando como espessante ou estabilizante. Também estende sua aplicação para a indústria de cosméticos, papel, farmacêutica e têxtil (GARCIA-OCHOA et al., 2000).

BECKER et al. (1998), ressaltam que a biossíntese da produção de xantana tem alcançado grande importância como foco de recentes pesquisas.



3. Material e Métodos

Obtenção das leveduras

HERNALSTEENS (2004) obteve amostras de pólen de flores, frutos (em perfeito estado de maturação) e solo, entre outros, que foram coletados em sacos plásticos ou tubos estéreis, e mantidos a 4 °C por no máximo três dias. Frações das amostras foram colocadas em tubos de ensaio com 10 mL de meio para enriquecimento, composto de 5% sacarose, 2% extrato de levedura (pH 6,5) e incubadas a 30 °C por 24 horas.

Seguindo a metodologia de CHEN & LIU (1996), a cultura acima foi transferida para frascos de Erlenmeyer (500 mL) contendo 100 mL de meio de cultura “padrão”, composto de 5% de sacarose, 2% extrato de levedura, 2% NaNO₃, 0,05% MgSO₄.7H₂O, 0,5% K₂HPO₄ (pH 6,5), e incubada a 30 °C, por 72 horas em agitador rotatório a 200 rpm. Posteriormente, estas culturas foram diluídas convenientemente para plaqueamento (cultivo em placas de Petri) com **meio padrão** contendo 2% de agar, e meio WLN (Wallerstein Laboratory Nutrient), por 72 horas a 30 °C. Para a inibição de bactérias, quando necessário, foram adicionados 50 ppm de ácido nalidíxico e ampicilina, após esterilização e resfriamento (50 °C) do meio (CASTRO, 1995).

O meio WLN também foi utilizado, uma vez que o uso deste pôde facilitar a diferenciação da morfologia das colônias (cor, forma, tamanho e textura). O meio WLN é composto de 4 g/L de extrato de levedura, 5 g/L de casitona, 50 g/L de dextrose, 0,55 g/L de fosfato monopotássico, 0,425 g/L de cloreto de potássio, 0,125 g/L de cloreto de cálcio, 0,25 g/L de sulfato de magnésio, 0,0025 g/L de cloreto férrico, 0,0025 g/L de sulfato de manganês, 0,022 g/L de verde de bromocresol e 20 g/L de agar (MALTO, 1997).

As colônias assim isoladas foram repicadas em agar inclinado (2,0% glicose, 0,5% extrato de levedura, 1,0% de extrato de malte, 0,2% fosfato de sódio monobásico, 2,0% agar e pH 5,5 – meio GYMP), incubados a 30 °C, até desenvolvimento das colônias, para posteriormente serem mantidas a 5 °C (cultura estoque – Tabela 6).

Tabela 6 – Relação dos microrganismos da cultura estoque coletados em distintas regiões do Brasil. CE: microrganismos coletado no Cerrado; FA: Floresta Amazônica; MA I: Mata Atlântica (vegetação próxima ao mar); MA II: Mata Atlântica (vegetação interiorana); PA: Pantanal; XA: microrganismos isolados de xarope; RQ: isolados de resíduo de queijo; SC: microrganismo sem codificação ou de origem desconhecida.

CE	51	AAG 2	102	AAQ 12	152	AG 6	203	AS 6	253	T 16	303	AW 3	353	G 01	
1	A+B 01	52	AAG 3	103	AAQ 14	153	AG 7	204	AS 6A	254	T 17	304	AW 4	354	G 02
2	A+B 02	53	AAG 5	104	AAQ 16	154	AH 1	205	AS 6A	255	T 18	305	AW 5	355	H 01
3	A+B 03	54	AAG 6	105	AAQ 17	155	AH 6	206	AS 6B	256	T 2	306	AW 6	356	H 1
4	AA 02	55	AAG 7	106	AAQ 2	156	AI 03	207	AS 8	257	T 3	307	AW 7	357	I 01
5	AA 03	56	AAG 8	107	AAQ 3	157	AI 6	208	AS 9	258	T 5	308	AW 8	358	I 02
6	AA 04	57	AAG 8	108	AAO 5	158	AI 7	209	AT 02	259	T 6	309	AX 1	359	I 03
7	AA 05	58	AAG 9	109	AAQ 5	159	AI 8	210	AT 03	260	T 8	310	AX 4	360	J 01
8	AAA 01	59	AAH 1	110	AAQ 6	160	AJ 02	211	AT 2	261	U 01	311	AX 6	361	J 06
9	AAA 1	60	AAH 3	111	AAQ 7	161	AJ 05	212	AT 7	262	U 03	312	AX 7	362	K 01
10	AAA 10	61	AAH 4	112	AAQ 8	162	AJ 10	213	AU 1	263	U 05	313	AX 8	363	K 1
11	AAA 11	62	AAH 5	113	AAQ 9	163	AJ 13	MA I		264	U 06	314	AX 9	364	L 01
12	AAA 2	63	AAI 1	114	AAR 1	164	AJ 14	214	AB 02	265	U 1	315	AY 7	365	L 02
13	AAA 4	64	AAI 2	115	AAR 2	165	AJ 3	215	AB 04	266	U 2	316	AY 10	366	L 03
14	AAA 6	65	AAI 3	116	AAR 5	166	AJ 6	216	AB 05	267	U 3	317	AY 11	367	L 04
15	AAA 7	66	AAI 4	117	AAS 1	167	AJ 7	217	AB 07	268	U 5	318	AY 12	368	M 01
16	AAA 9	67	AAI 5	118	AAS 10	168	AJ 8	218	AB 08	269	U 6	319	AY 13	369	M 01
17	AAB 1	68	AAI 6	119	AAS 12	169	AK 2	219	AB 09	270	V 01	320	AY 2	370	M 02
18	AAB 1	69	AAJ 1	120	AAS 3	170	AK 3	220	AB 1	271	V 02	321	AY 3	371	M 03
19	AAB 10	70	AAJ 2	121	AAS 4	171	AK 3	221	AB 10	272	V 03	322	AY 4	372	M 3
20	AAB 11	71	AAJ 4	122	AAS 5	172	AK 6	222	AB 11	273	V 04	323	AY 6	373	N 02
21	AAB 12	72	AAJ 5	123	AAS 8	173	AK 7	223	AB 12	274	V 07	324	AY 7	374	O 01
22	AAB 2	73	AAJ 6	124	AAT 1	174	AK 9	224	AB 13	275	V 10	325	AY 9	375	O 02
23	AAB 3	74	AAK 1	125	AAT 10	175	AL 1	225	AB 14	276	V 11	326	AY 9	376	O 03
24	AAB 4	75	AAK 10	126	AAT 12	176	AL 1B	226	AB 3	277	V 2	327	AZ 1	377	O 04
25	AAB 5	76	AAK 12	127	AAT 2	177	AL 2	227	AC 01	278	V 3	328	AZ 11	378	P 01
26	AAB 7	77	AAK 4	128	AAT 3	178	AL 3	228	AC 02	279	V 3	329	AZ 12	379	Q 01
27	AAB 8	78	AAK 5	129	AAT 4	179	AM 2	229	AC 03	280	X 01	330	AZ 13	380	Q 02
28	AAC 1	79	AAL 1	130	AAT 5	180	AM 3	230	AC 04	281	X 02	331	AZ 14	381	Q 03
29	AAC 2	80	AAL 2	131	AAT 7	181	AM 4	231	AC 06	282	X 04	332	AZ 15	382	S 01
30	AAC 3	81	AAL 4	FA		182	AN 2	232	AC 07	283	X 05	333	AZ 16	383	S 1
31	AAC 6	82	AAM 6	132	AE 06	183	AO 05	233	AC 08	284	X 06	334	AZ 17	XA	
32	AAC 7	83	AAN 1	133	AE 1	184	AO 4	234	AD 1	285	X 07	335	AZ 2	384	AAU 1
33	AAC 8	84	AAN 2	134	AE 4	185	AO 6	235	AD 10	286	X 08	336	AZ 3	RQ	
34	AAC 9	85	AAN 3	135	AE 06	186	AO 7	236	AD 11	287	Z 02	337	AZ 4	385	AAV 1
35	AAD 5	86	AAN 5	136	AE 8	187	AP 2	237	AD 14	288	Z 04	338	AZ 5	386	AAV 2
36	AAD 6	87	AAN 6	137	AF 05	188	AP 4	238	AD 9	289	Z 06	339	AZ 9	387	AAV 3
37	AAD 7	88	AAO 1	138	AF 08	189	AP 6	239	T 01	290	Z 07	PA		388	AAV 4
38	AAF 1	89	AAO 13	139	AF 1	190	AQ 1	240	T 02	291	Z 3	340	C 01	389	AAV 5
39	AAF 2	90	AAO 14	140	AF 10	191	AQ 3	241	T 03	292	Z 4	341	C 1	SC	
40	AAF 3	91	AAO 15	141	AF 11	192	AQ 5	242	T 04	293	Z 5	342	D 01	390	?
41	AAF 4	92	AAO 3	142	AF 13	193	AQ 6	243	T 05	294	Z 7	343	D 1		
42	AAF 5	93	AAO 5	143	AF 14	194	AR 3	244	T 07	MA II		344	E 01		
43	AAF 6	94	AAO 5	144	AF 2	195	AS 03	245	T 08	295	AV 2	345	E 02		
44	AAF 7	95	AAP 3	145	AF 4	196	AS 10	246	T 09	296	AV 3	346	E 03		
45	AAG 1	96	AAP 4	146	AF 6	197	AS 12	247	T 10	297	AV 4	347	E 1		
46	AAG 11	97	AAP 5	147	AF 7	198	AS 13	248	T 11	298	AV 5	348	E 2		
47	AAG 12	98	AAP 7	148	AG 1	199	AS 14	249	T 12	299	AV 6	349	F 01		
48	AAG 14	99	AAP 8	149	AG 2	200	AS 2	250	T 13	300	AV 7	350	F 03		
49	AAG 15	100	AAQ 1	150	AG 3	201	AS 4	251	T 14	301	AW 1	351	F 1		
50	AAG 16	101	AAQ 10	151	AG 6	202	AS 5	252	T 15	302	AW 2	352	F 1		

Triagem das Leveduras Produtoras de Amilases

As cepas de leveduras produtoras de amilases foram selecionadas devido à capacidade de degradação de amido solúvel como única fonte de carbono. O meio seletivo foi preparado com a seguinte composição: amido solúvel, 20,0 g/L; extrato de levedura, 10,0 g/L; peptona, 10 g/L; agar, 15 g/L. O pH foi ajustado para 5,0 com HCl.

Procedimento padrão: o meio de cultura foi pré-aquecido em forno de microondas (Brastemp Clean 28 L, Manaus, Amazonas, Brasil) para solubilização do agar após acerto de pH e esterilizado em autoclave vertical (Phoenix AV Plus, Araraquara, São Paulo, Brasil) a 121 °C por 15 minutos. O meio, ainda liquefeito, foi entornado em placas de Petri contidas em câmara de fluxo laminar (Veco UFFS-12, Campinas, São Paulo, Brasil) esterilizada, onde foi executado todo o experimento. Após solidificação do meio, as placas de Petri foram divididas em 8 câmaras, segundo exposto por meio da Figura 12, nas quais foram inoculadas as cepas de leveduras da cultura estoque.

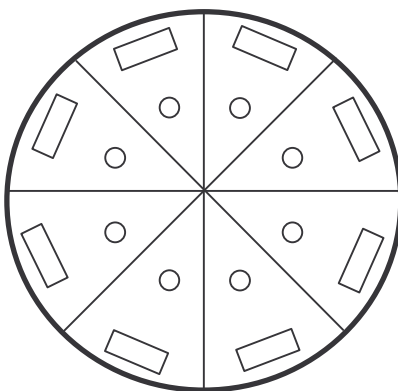


Figura 12 - Representação esquemática do fundo de uma placa de Petri dividida em 8 câmaras com as regiões demarcadas (□: região reservada à identificação da cepa de levedura testada; ○: região reservada à inoculação do microrganismo).

A inoculação dos microrganismos foi feita pela introdução de alça de repicagem flambada e resfriada diretamente nos tubos com a cultura e passagem para a placa de

Petri previamente demarcada com 8 zonas para inoculação de cada cepa devidamente codificada.

As placas foram mantidas em câmaras de incubação (New Brunswick G-27 Psicrotherm, Nova Jersey, Estados Unidos) sob temperatura de 30 °C por 48h. Logo após, realizou-se a revelação das placas com utilização de solução de lugol (iodo, 10,0 g/L; iodeto de potássio, 20,0 g/L) até cobrir toda a superfície do agar. Após 30 minutos, a solução de lugol foi descartada e as colônias de leveduras produtoras de amilases puderam ser observadas devido à formação de um halo descolorido ao redor da colônia, evidenciando ausência do amido solúvel original e, assim, a capacidade de produção de amilases.

Atividade Amilolítica em Meio Sólido

Após o teste preliminar de triagem, as leveduras selecionadas seguiram para o teste de atividade amilolítica em meio sólido.

O teste seguiu o mecanismo proposto por STAMFORD (1998) com modificações em relação ao meio de cultura utilizado, que foi idêntico àquele do processo de triagem.

As leveduras foram inoculadas em placas de Petri individuais devidamente identificadas com o código referente ao microrganismo em teste. A inoculação foi feita no centro da placa com alça de repicagem com ponta em forma de agulha.

Os microrganismos foram incubados a 30 °C por 96 h. A placa foi colorida com solução de lugol por 30 minutos e, logo depois, descartada. Em torno da colônia crescida, evidenciou-se um halo descolorido devido à ausência do amido original. As medições do

diâmetro do halo produzido foram feitas com paquímetro em três dimensões distintas tanto da colônia crescida quanto do halo formado.

A atividade enzimática foi determinada segundo AGNOSTAKIS et. al. (1975) através da relação entre o diâmetro médio do halo de degradação e o diâmetro médio da colônia, expressa como índice enzimático de atividade (IEA) [equação 3].

$$IEA = \frac{\text{diâmetro do halo descolorido (cm)}}{\text{diâmetro da colônia (cm)}} \quad (3)$$

O experimento foi conduzido seguindo um delineamento inteiramente casualizado em triplicata e os dados obtidos foram analisados através da análise de variância. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5 % de probabilidade ($p \leq 0,05$) com utilização do software STATISTICA® 6.0.

Atividade Amilolítica em Meios Agitados

Do estoque de culturas disponíveis, foram selecionadas 5 cepas depois de testes preliminares de atividade enzimática em meio sólido. Para este teste, foi elaborado o meio de cultura contendo amido solúvel, 20 g/L; extrato de levedura, 10 g/L e peptona, 10 g/L. O pH foi ajustado para 5,5 com HCl. 100 mL de meio foram separados em frascos de Erlenmeyer e autoclavados a 121 °C por 15 minutos. Uma alçada direta na cultura estoque, em agar inclinado, foi passada aos frascos estéreis e submetidos a agitação de 200 rpm em agitadores termostáticos sob temperatura controlada de 30 °C por 96 h.

Ao fim da fermentação, o meio de cultura foi submetido à centrifugação com 10000 rpm e temperatura de 5 °C por 15 minutos. O sobrenadante em que se encontrava a enzima produzida extracelularmente foi separado em frascos de cor âmbar devidamente identificados com o código referente à cepa de microrganismo a ser testado e estocado sob congelamento em freezer para posterior verificação da atividade enzimática.

Para o teste de atividade enzimática, alíquotas de 19 mL de solução de amido solúvel (2 g/L) em tampão fosfato 0,05 M e pH 5,2. Foram mantidas em frascos sob agitação em banho termostático a 40, 50 e 60 °C. Em seguida, alíquotas de 1 mL da solução centrifugada contendo a enzima foram adicionadas no frasco. Alíquotas de 1 mL foram coletadas por 10 minutos a cada 2 minutos de atuação da enzima e adicionados em tubos de ensaio contendo 1 mL de DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico). Também foi coletada uma alíquota da amostra no tempo zero da reação para ajuste da concentração de açúcares redutores formados a partir da hidrólise das ligações glicosídicas da molécula de amido, caso houvesse na composição do sobrenadante coletado, teores relevantes de açúcares redutores provenientes da fermentação quando no preparo da enzima por centrifugação.

Os tubos foram submetidos a banho fervente por 5 minutos para pronunciamento da cor e em seguida, transferidos para banho de gelo para que a coloração adquirida se tornasse estável. Alíquotas de 8 mL de solução de tartarato duplo de sódio e potássio 0,05 M foram adicionadas a cada tubo para posterior leitura em espectrofotômetro, seguindo a metodologia proposta por MILLER (1959) com modificações na quantidade de tartarato adicionada. A absorbância foi medida a 540 nm. Uma unidade de atividade foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 µmol de glicose por minuto de reação, nas condições do ensaio.

Triagem das Leveduras Produtoras de Celulases

Foram selecionadas as leveduras capazes de degradar a carboximetilcelulose (CMC) ou a celulose como únicas fontes de carbono em experimentos distintos.

Para verificação da capacidade produtiva de CMCase, o meio seletivo foi preparado com a seguinte composição: carboximetilcelulose (CMC), 10 g/L; extrato de levedura, 0,6 g/L; KH_2PO_4 , 7,0 g/L; K_2HPO_4 , 2,0 g/L; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,1 g/L; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1,0 g/L; agar, 15,0 g/L. O pH foi ajustado para 5,0 com HCl.

O restante do experimento foi conduzido de maneira idêntica àquele realizado com o teste de produção de amilases (procedimento padrão).

As placas foram mantidas em câmaras de incubação (New Brunswick G-27 Psicrotherm, Nova Jersey, Estados Unidos) sob a temperatura de 30°C por 96h. Logo após, realizou-se a revelação das placas com utilização de solução de vermelho do congo (1,4 g/L) em tampão TRIS-HCl 0,1 M pH 8,0 até cobrir toda a superfície do agar. Após 30 minutos, esta solução foi descartada e o agar foi recoberto por uma solução de NaCl 0,5 M no mesmo tampão por mais 30 minutos e, em seguida, lavado com água destilada.

Ao fim deste processo de triagem, as cepas produtoras de CMCase foram testadas quanto à produção de celulases a partir da fonte de carbono (celulose de troca iônica).

Para verificação da capacidade produtiva de Celulases o meio seletivo foi preparado com a mesma composição do meio para o teste de CMCase, exceto pela substituição da fonte de carbono (SERVACEL®). O restante do experimento foi conduzido de maneira similar àquele da verificação da capacidade produtiva de CMCase.

As cepas de leveduras produtoras de carboximetilcelulase (CMCase) e celulases foram selecionadas por meio da observação de um halo descolorido em torno da colônia testada.

Atividade Celulolítica em Meio Sólido

Microorganismos selecionados do processo de triagem foram submetidos a testes de atividade enzimática seguindo a metodologia proposta por STAMFORD et. al. (1998) com alterações.

As leveduras foram inoculadas em placas de Petri individuais devidamente identificadas com o código referente ao microrganismo em teste. O meio de cultura utilizado foi idêntico àquele do processo de triagem. A inoculação foi feita no centro da placa com alça de repicagem com ponta em forma de agulha.

Os microrganismos foram incubados a 30 °C por 96h. A placa foi colorida com solução de vermelho do congo em tampão TRIS HCl 0,1 M e pH 8,0 por 30 minutos e, logo depois, a solução foi descartada. Uma lavagem com NaCl no mesmo tampão foi realizada por mais 30 minutos. Em torno da colônia crescida, formou-se um halo descolorido devido à ausência da celulose original. As medições do diâmetro do halo produzido foram feitas com paquímetro em três dimensões distintas tanto da colônia crescida quanto do halo formado.

A atividade enzimática foi determinada segundo AGNOSTAKIS et. al. (1975) através da relação entre o diâmetro médio do halo de degradação e o diâmetro médio da colônia, expressa como índice enzimático de atividade (IEA), determinada por meio da equação 3.

O experimento foi conduzido seguindo um delineamento inteiramente casualizado em triplicata e os dados obtidos foram analisados através da análise de variância. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5 % de probabilidade ($p \leq 0,05$) com utilização do sistema aplicativo STATISTICA® 6.0.

Atividade Celulolítica em Meios Agitados

Do estoque de culturas disponíveis, cepas foram selecionadas depois de testes preliminares de atividade enzimática em meio sólido. Para o teste, foi elaborado o meio de cultura para produção da enzima contendo celulose de troca iônica (SERVACEL®), 20,00 g/L; extrato de levedura, 0,60 g/L; KH_2PO_4 , 7,00 g/L; K_2HPO_4 , 2,00 g/L; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,15 g/L; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1,00 g/L; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,01 g/L e KCl, 0,50 g/L. O pH foi ajustado para 5,5 com HCl. Alíquotas de 100 mL do meio foram adicionados em frascos de Erlenmeyer de 500 mL e autoclavados a 121 °C por 15 minutos. Os inóculos crescidos em meio GYMP por 96 horas foram transferidos para frascos estéreis previamente codificados e submetidos a agitação de 150 rpm sob temperatura controlada de 30 °C. O processo de produção enzimática decorreu por 120 e 240 h.

Ao final da fermentação, o meio de cultura foi submetido à centrifugação com 10000 rpm e temperatura de 5 °C por 20 minutos. O sobrenadante em que se encontrava a enzima produzida extracelularmente foi separado em frascos de cor âmbar devidamente identificados com o código referente à cepa de microrganismo a ser testado e estocado sob congelamento em freezer para posterior verificação da atividade enzimática.

Para os testes, foram realizados 3 experimentos para verificação da capacidade hidrolítica de cada enzima centrifugada. A saber:

1. Atividade de CMCase: seguindo a proposta de OGAWA et. al. (1982) com algumas alterações, a amostra reacional continha 2,0 mL de CMC (10 g/L) em tampão acetato 0,2 M, pH 5,2. Um volume de 0,1 mL da solução enzimática foi adicionado a cada amostra reacional em banho termostático a 45 e 60 °C por 10 minutos. A amostra teve a reação interrompida com adição de DNS (ácido dinitrosalicílico) e posterior banho fervente por 5 minutos, seguido de banho de gelo. Às amostras foram adicionados 8,0 mL de tartarato duplo de sódio e potássio 0,05 M. Os açúcares redutores liberados foram medidos a 540 nm (MILLER, 1959). Também foi coletada alíquota de 1 mL no tempo zero da reação para eventuais interferências caso houvesse açúcar redutor na solução enzimática. Uma unidade de atividade de CMC foi determinada como a capacidade da enzima em liberar 1 μ mol de glicose por minuto a partir da CMC original nas condições do ensaio.

2. Atividade de celobiase: a mistura reacional continha 0,1 mL de solução de celobiose 20 mM em tampão acetato 0,2 M, pH 5,2. Um volume de 0,1 mL da solução enzimática foi adicionado à mistura reacional em banho termostático a 45 °C por 30 minutos. A reação foi paralisada depois de 30 minutos por incubação em banho fervente por 5 minutos, seguido de banho de gelo. O teor de glicose formada foi determinado pelo método da glicose-oxidase (HENRY et. al, 1974). Uma unidade de atividade de celobiase foi definida como a capacidade da enzima em produzir 1 μ mol de glicose por minuto a partir da celobiose original nas condições do ensaio.

3. Atividade de hidrólise em papel de filtro (FPase): seguindo a proposta de MANDELS et. al. (1976) com algumas alterações, foram pesados 50 mg de papel de filtro Whatman número 1 (fonte de celulose) e adicionados a tubos de

ensaio contendo 2 mL de tampão acetato 0,2 M, pH 5,5. Um volume de 1 mL da solução enzimática foi adicionado ao tubo em banho termostático a 45 °C por 1 hora. A amostra foi incubada em banho em ebulição por 5 minutos e depois em banho de gelo. Os açúcares redutores liberados foram medidos com ácido dinitrosalicílico em leitura espectrofotométrica a 540 nm (MILLER, 1959). Uma unidade de atividade de FPase foi determinada como a capacidade da enzima em liberar 1 μ mol de glicose por minuto a partir do papel de filtro original.

Triagem das Leveduras Produtoras de gomas

O meio de cultura seletivo foi preparado com a seguinte composição: sacarose, 150,0 g/L; extrato de levedura, 20,0 g/L; K_2HPO_4 , 20,0 g/L; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,2 g/L; $MnSO_4 \cdot H_2O$, 0,01 g/L; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,01 g/L; NaCl, 0,01 g/L; $CaCl_2$, 0,02 g/L; agar, 20,0 g/L. O pH foi ajustado para 5,0 com HCl.

O restante do experimento foi conduzido de maneira idêntica àquele realizado com o teste de produção de amilases (procedimento padrão), exceto pelo fato de cada placa conter apenas 4 zonas demarcadas e não 8. Essa distinção do procedimento se deu pelo fato de o crescimento microbiano ser rápido e proeminente, o que poderia ocasionar invasão das zonas vizinhas pelas colônias em crescimento.

As placas foram mantidas em câmaras de incubação (New Brunswick G-27 Psicrotherm, Nova Jersey, Estados Unidos) a 30 °C por 24h.

Foram considerados potenciais produtores de gomas aqueles microrganismos cujas cepas foram capazes de produzir, em torno da colônia em crescimento, um material gelatinoso, ou gomoso, típico de microrganismos reconhecidamente produtores de gomas (Figura 13). Um teste comparativo foi realizado com *Xanthomonas campestris* sob as mesmas condições do teste descrito.



Figura 13 - Cultura de *Xanthomonas campestris* produtora de goma xantana em meio com sacarose.

4. Resultados e Discussão

Os Processos de Triagem

A análise das placas de Petri coloridas em solução de lugol permitiu observação do halo descolorido como mostrado por meio da Figura 14a, demonstrando a produção de amilases.

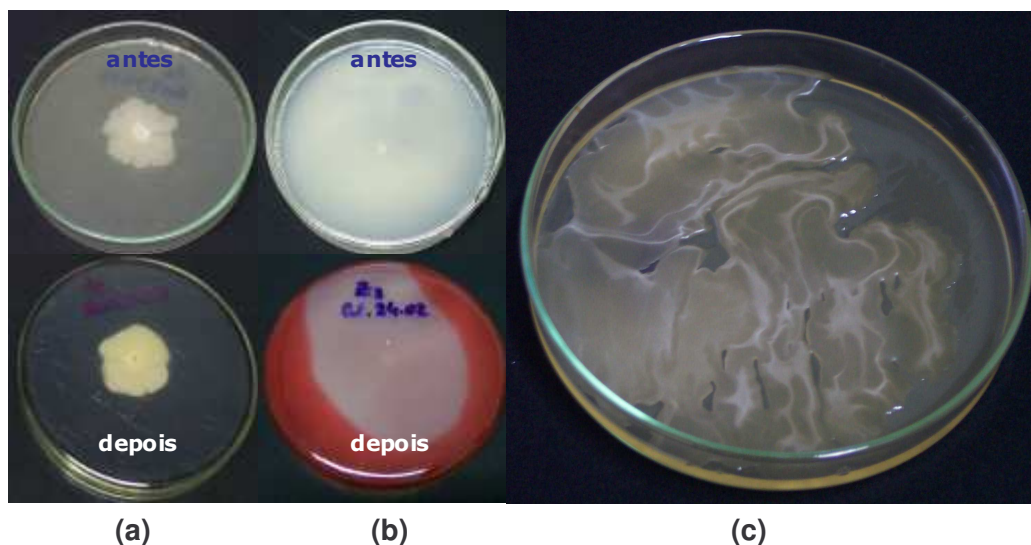


Figura 14 - Resultados obtidos na triagem dos microrganismos produtores de amilases (a) e celulasas (b), antes e depois da coloração, e de gomas (c) em meio sólido.

De maneira similar, as cepas produtoras de CMCase e celulasas foram selecionadas a partir da observação das placas de Petri coloridas por solução de vermelho do congo com posterior formação de halo descolorido como na Figura 14b.

A Figura 14c ilustra a levedura produtora de polissacarídeo.

Quanto à produção de enzimas, testes que não indicaram resultados com transparência foram considerados positivos.

A Tabela 7 apresenta as cepas de leveduras selecionadas na triagem da capacidade produtiva de gomas enquanto na Tabela 8 pode-se observar a porcentagem de leveduras produtoras de amilases, CMCase, celulasas e gomas selecionadas entre as 390 cepas selvagens da coleção de culturas do Laboratório de Engenharia de Bioprocessos do Departamento de Engenharia de Alimentos da Unicamp.

Tabela 7 – Leveduras selecionadas da triagem de produção de gomas.

AAB₂	AAO₁₄	AF₁₁	AK₃	AS₄
AAG₁₅	AAO₁₅	AF₂	AK₃	AT₇
AAG₃	AAP₄	AF₆	AM₂	AX₄
AAG₉	AAQ₁₇	AH₆	AM₄	U₂
AAH₃	AAU₁	AI₆	AQ₁	U₃
AAJ₄	AB₀₅	AJ₁₃	AQ₃	Z₃
AAJ₆	AE₀₆	AJ₇	AS₁₂	Z₅

Tabela 8 – Porcentagem de leveduras selecionadas dos processos de triagem.

Teste realizado	Método de visualização	n° de leveduras selecionadas	% do total
Amilases	<i>Coloração com lugol</i>	45	11,54
CMCase	<i>Coloração com vermelho do congo</i>	84	21,54
Celulasas	<i>Coloração com vermelho do congo</i>	46	11,79
Gomas	<i>Visualização a olho nu</i>	35	8,97

Atividade Enzimática em Meio Sólido

As 45 cepas de leveduras selecionadas no processo de triagem da produção de amilases foram investigadas quanto à atividade enzimática em meio sólido. O mesmo ocorreu com as 46 cepas produtoras de celulases.

A triagem para produção de gomas foi considerada satisfatória visto que testes para averiguar o tipo de goma produzida serão realizados a *posteriori*.

As médias das atividades de amilases (Tabela 9) e celulases (Tabela 10) foram comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5 % de probabilidade ($p \leq 0,05$) com utilização do software STATISTICA® 6.0.

A determinação do Índice de Atividade Enzimática (IEA), ou seja, a relação entre o diâmetro médio do halo de hidrólise e o diâmetro médio da colônia, permitiu verificar que a cepa de leveduras **AH₆-1** se destaca como produtora de amilase (Figura 15). Todavia, as leveduras que produziram, em média, resultados maiores, independente de serem consideradas iguais estatisticamente (Tabela 9), também foram selecionadas para o teste de produção de amilases em meio líquido sob agitação.

Tabela 9 – Médias dos índices de atividade enzimática (IEA) de amilases das leveduras em meio sólido.

Microrganismo testado	IEA (média)	Origem
T₀₅	1,487	Mata Atlântica I
AF₁	1,858	Floresta Amazônica
AH₆-1	2,587	Floresta Amazônica
AK₇	1,859	Floresta Amazônica
AAO₁₅	1,479	Cerrado

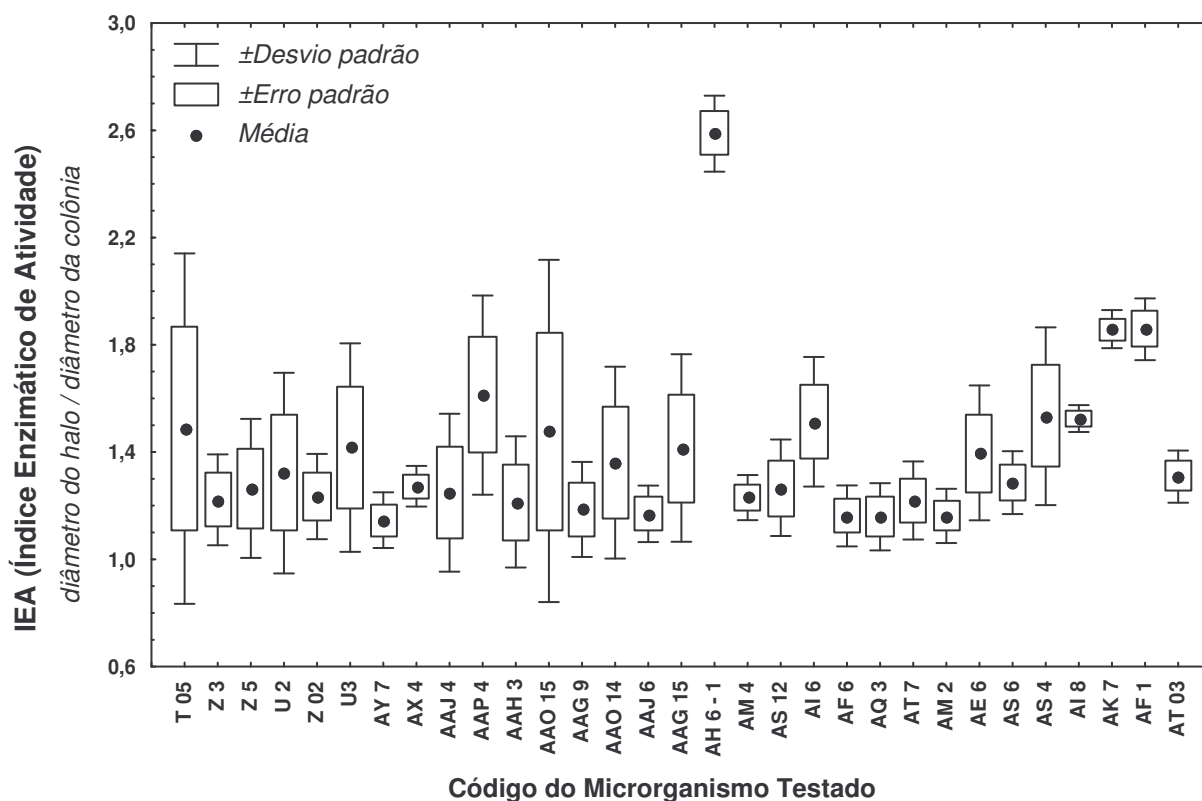


Figura 15 - Análise dos desvios e erros das médias de atividade enzimática de amilases das leveduras pré-selecionados através da formação de halos de hidrólise em meio sólido contendo amido.

Para a atividade de celulasas, não houve diferença estatisticamente significativa entre as médias (Figura 16). Dessa forma, as cepas de microrganismos que produziram as maiores atividades em pelo menos um dos testes de médias realizados em triplicata foram, em seguida, testadas quanto à produção de celulasas em meio líquido.

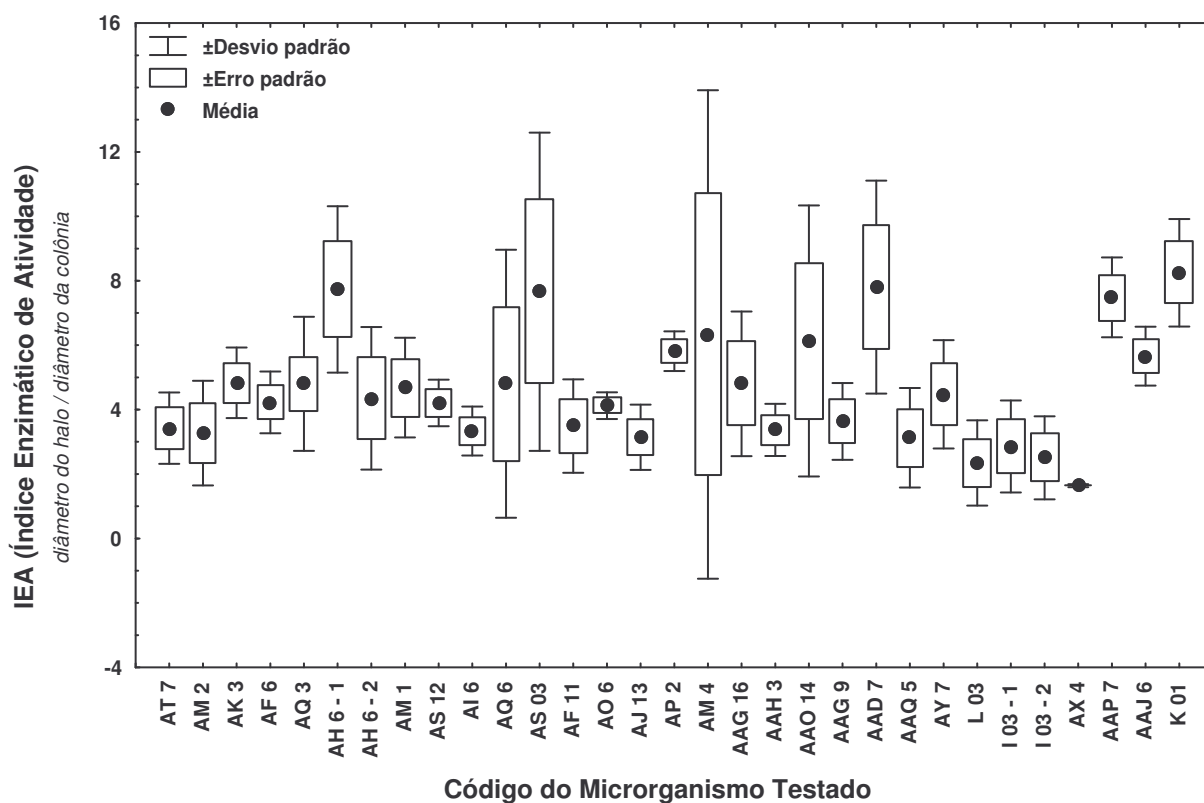


Figura 16 - Análise dos desvios e erros das médias de atividade enzimática de celulasas das leveduras pré-selecionadas através do teste em Placas de Petri.

Neste caso, todas as médias foram consideradas estatisticamente iguais.

Esse mecanismo de seleção foi adotado tendo em vista o alto desvio-padrão entre as médias estudadas, o que poderia levar a considerar um bom produtor como insuficiente. Assim, foram selecionadas as cepas codificadas como exposto na Tabela 10.

Tabela 10 - Médias dos índices de atividade enzimática (IEA) de celulasas das leveduras em meio sólido.

Microrganismo testado	IEA (média)	Origem
K₀₁	8,250	Pantanal
AH₆-1	7,732	Floresta Amazônica
AH₆-2	4,351	Floresta Amazônica
AK₃	4,832	Floresta Amazônica
AM₁	4,687	Floresta Amazônica
AM₄	6,333	Floresta Amazônica
AP₂	5,816	Floresta Amazônica
AQ₆	4,806	Floresta Amazônica
AQ₃	6,388	Floresta Amazônica
AS₀₃	7,660	Floresta Amazônica
AY₇	4,475	Mata Atlântica II
AAD₇	7,805	Cerrado
AAG₁₆	4,801	Cerrado
AAJ₆	5,659	Cerrado
AAO₁₄	6,131	Cerrado
AAP₇	7,487	Cerrado

Microrganismos enumerados com respectivos código e origem.

Atividade Enzimática em Meio Líquido

O resultado dos testes de atividade enzimática para as cepas produtoras de amilases demonstra que, para o microrganismo de código AAO₁₅, o aumento da temperatura influencia positivamente no aumento da atividade enzimática (Figura 17). Para os demais microrganismos, a situação em que há melhor atividade é aquela em que a temperatura está a 50 °C, exceto para o microrganismo codificado como T₀₅ em que há leve queda de atividade em relação àquela a 60 °C. Essas características permitem inferir que a temperatura de maior produção da enzima nas condições estudadas está em torno de 50 °C para as cepas AK₇ e AF₁ enquanto para as cepas AAO₁₅ e T₀₅ nada se pode dizer, embora o aumento da temperatura provoque aumento da atividade enzimática. Todavia, estudos mais detalhados com relação à composição dos meios de cultura e de crescimento do inóculo bem como a agitação, aeração, pH, dentre outros parâmetros, devem ser realizados para a otimização da produção de enzima.

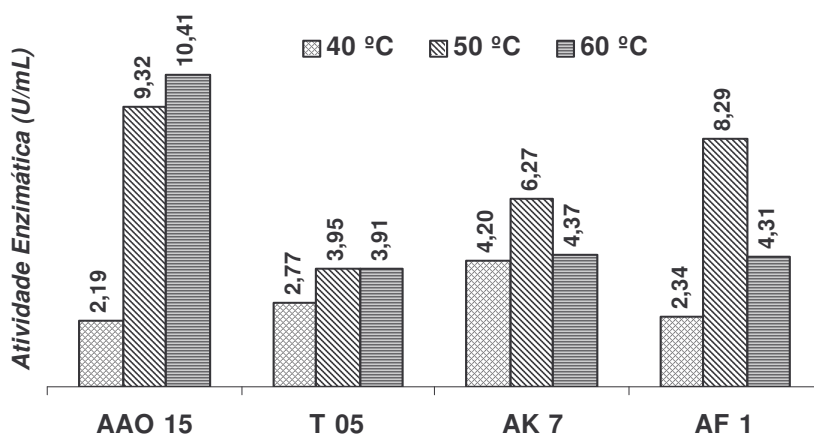


Figura 17 - Atividades das amilases das leveduras a 40 °C, 50 °C e 60 °C.

A cepa AH₆-1 não produziu amilase após fermentação em frascos agitados por 96 h a 30 °C e teste de atividade enzimática a 40 °C, 50 °C e 60 °C. Dessa forma, uma nova etapa de experimentos foi realizada nos intervalos de 12, 24, 36 e 48 h de produção da enzima em frascos agitados com utilização de um inóculo com a cepa ativada em meio GYMP por 48 h sob agitação de 150 rpm a 30 °C.

Esse procedimento foi adotado tendo em vista a alta produtividade em meio sólido, o que poderia resultar em alta produtividade em meios líquidos sob agitação.

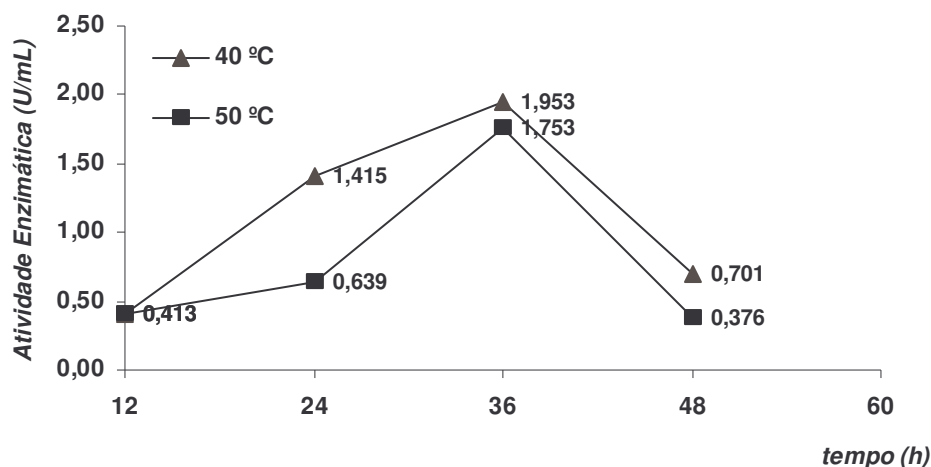


Figura 18 - Atividade amilolítica da cepa AH₆-1 nas temperaturas 40 e 50 °C.

Assim, percebeu-se a existência de pequenos valores de atividade amilolítica (Figura 18) em comparação às demais cepas testadas (Figura 17). Seria valioso testar a atividade a menores temperaturas, tendo em vista que a atividade amilolítica decresce com aumento da temperatura. Também por isso, não foi realizado o teste a 60 °C, pois o objetivo deste experimento foi verificar a condição mais próxima da ideal para maior atividade enzimática.

Contudo, a levedura *Cryptococcus flavus* descrita por Wanderley et. al. (2004) apresentou maior produção de α -amilase após 24 h de fermentação a 25 °C. a enzima mostrou atividade ótima a 50 °C.

Nos testes de atividade de celulase, os experimentos foram subdivididos em três partes a fim de se obter a característica de degradação da celulose a partir de substratos menos polimerizados como CMC e celobiose até chegar a atividade em papel de filtro.

Para o teste de atividade de CMCase, percebeu-se comportamentos distintos em relação ao aumento da temperatura. Também, destacou-se o fato de a cepa AAD₇ não apresentar atividade de CMCase (Figura 19).

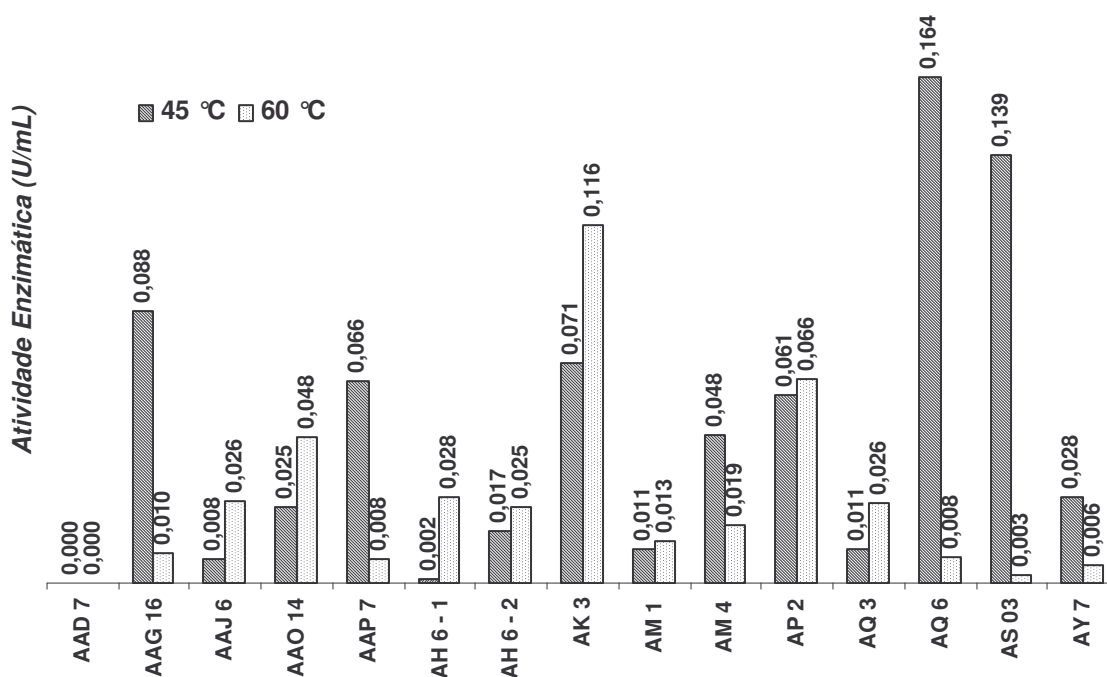


Figura 19 - Atividade de CMCase a 45 e 60 °C. Enzimas produzidas a 30 °C e 150 rpm.

As leveduras AQ₆ e AS₀₃ produziram maior atividade de CMCase entre as cepas testadas sendo que as enzimas apresentaram maior atividade a 45 °C do que a 60 °C.

Algumas cepas como AAG₁₆, AAP₇, AK₃, AM₄, AQ₆, AS₀₃ e AY₇ produziram enzimas sensíveis às variações de temperatura quando variou-se de 45 °C para 60 °C.

A CMCase da cepa AK₃ apresentou maior atividade a 60 °C (0,0116 U/mL) que a 45 °C (0,07 U/mL) nas condições estudadas.

A Figura 20 ilustra que a cepa AQ₆ produziu maior atividade de celobiase entre as cepas testadas, sendo que foi obtido 0,216 U/mL e 0,188 U/mL de celobiase após 120 e 240 h de fermentação em frascos agitados a 150 rpm e 30 °C.

Nos testes de atividade de celobiase (Figura 20), percebeu-se que tempos mais prolongados de fermentação (240 h) aumentaram a produção de enzimas. Contudo, este fato não se observa para as cepas AAP₇ e AQ₆.

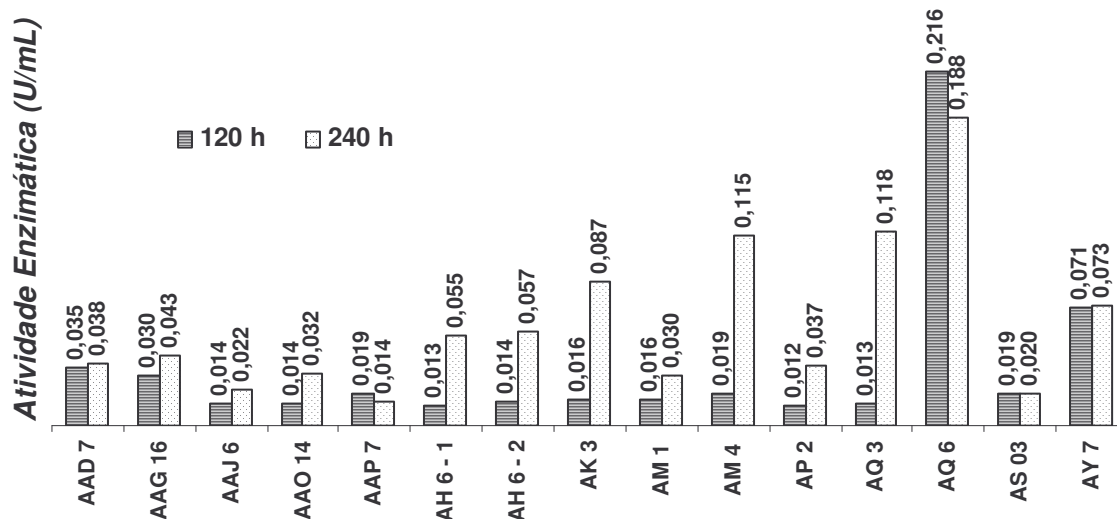


Figura 20 - Atividade de celobiase. Enzimas produzidas em tempos de 120 e 240 h em meios agitados a 150 rpm e 30 °C.

O tempo mais prolongado de fermentação pode estimular a maior produção de enzimas desde que se lance a hipótese de ter sido esgotada a glicose do inóculo, que é fator de inibição da produção de celulasas.

A Figura 21 ilustra que as leveduras AP₂, AQ₃ e AY₇ produziram maior atividade de FPase entre as cepas testadas (0,034 U/mL, 0,038 U/mL e 0,041 U/mL respectivamente) após 120 h de fermentação em frascos agitados a 150 rpm e 30 °C.

A atividade do complexo celulase sobre papel de filtro (FPase) (Figura 21) teve relação direta com o tempo de fermentação apenas para as cepas AAG₁₆, AAP₇ e AM₄. Para as demais, o tempo de fermentação de 120 h foi mais favorável.

Ao contrário do que se previu para a atividade de celobiase, o teste de atividade de FPase revela que tempos menores de fermentação promovem a produção do complexo celulase com maior atividade. Estudos com tempos de fermentação inferiores a 120 h seriam valiosos para avaliação da atividade nesse substrato.

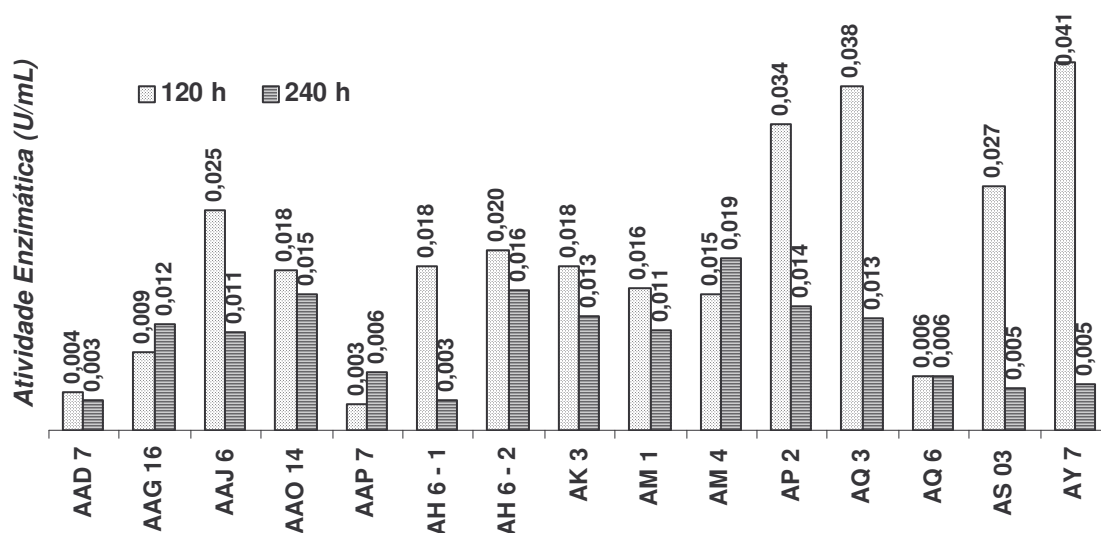


Figura 21 - Atividade de FPase. Enzimas produzidas em tempos de 120 e 240 h em meios agitados a 150 rpm e 30 °C.

De modo geral, as atividades enzimáticas aqui reveladas ainda são reduzidas em comparação com microrganismo já estudados com maior profundidade. O que se pode ressaltar é o fato da existência de cepas de leveduras que, sob determinadas condições, produzem enzimas de interesse biotecnológico e, ainda, devem ser alvo de estudos mais detalhados.

5. Conclusões

- Há um estoque promissor para produção em larga escala de produtos de interesse biotecnológico como amilases, celulasas e gomas a partir das cepas de leveduras estudadas;
- As leveduras testadas apresentaram capacidade de produção de goma no meio seletivo contendo sacarose quando comparadas com a colônia de *Xanthomonas campestris* crescida no mesmo meio;
- Os testes colorimétricos aplicados neste trabalho revelam, além da capacidade produtiva de determinado insumo, a atividade enzimática potencial de cada microrganismo cultivado em meio sólido devido à evidência do halo formado pelo consumo do substrato utilizado;
- Análises quantitativas preliminares de atividade enzimática podem ser realizadas com a utilização da mesma técnica aplicada para a triagem dos microrganismos em meio sólido por meio do Índice Enzimático de Atividade (IEA), que relaciona o diâmetro do halo formado com o diâmetro da colônia, e produz resultados convincentes com relação à hidrólise do substrato testado;
- A cepa AH₆-1 produz amilases com atividades enzimáticas superiores às demais quando submetidas a testes em meios sólidos (IEA de 2,587). Em comparação com resultados apresentados por STAMFORD (1998), a cepa de levedura AH₆-1 tem IEA em meio sólido maior que aquela apresentada por *Aspergillus sp.* (2,0) e menor que a de *Bacillus sp.*(3,6);

- A cepa de levedura AH₆-1 pode ter sofrido alguma repressão quando submetida ao crescimento em meio líquido, visto que sua atividade em meios sólidos (IEA de 2,587) foi destacada em relação às demais enquanto que em meio líquido sob agitação de 200 rpm em fermentação por 96 h a 30 °C, a atividade enzimática (1,953 U/mL) foi considerada baixa em comparação às outras cepas testadas nas mesmas condições. Esta característica pode mudar se as condições de fermentação em meio líquido forem otimizadas.
- Pode ser também que a cultura AH₆-1 usada no teste em placas de Petri com meio contendo amido estivesse contaminada com bactéria amilolítica, o que é muito comum em estudo de seleção de leveduras amilolíticas;
- Dentre as cepas testadas para atividade amilolítica em meio sólido, aquelas coletadas na região da Floresta Amazônica (AH₆-1, AF₁ e AK₇) apresentaram maiores atividades em relação às cepas coletadas no Cerrado (AAO₁₅) e Mata Atlântica I (T₀₅);
- Para o teste de atividade celulolítica em meio sólido, a cepa K₀₁, coletada na região do Pantanal, apresentou maior IEA (8,250);
- O aumento de temperatura pode ser uma variante do processo que conduz ao aumento da atividade enzimática. Todavia, para atividade amilolítica em meios líquidos, apenas as amilases produzidas pela cepa AAO₁₅ tiveram valores de atividade enzimática aumentados quando a temperatura foi aumentada de 50 para 60 °C;
- Para atividade amilolítica, a cepa AAO₁₅, crescida em meios sob agitação de 150 rpm e 30 °C, produziu enzimas com atividade de 10,41 U/mL, que foi o maior resultado obtido quando fermentava amido solúvel a 60 °C;

- Para o caso da cepa AH₆-1, mesmo com a utilização do inóculo ativado, a maior atividade amilolítica obtida foi de, aproximadamente, 2,00 U/mL a 40 °C após produção da enzima em meio contendo amido solúvel a 30 °C após fermentação de 36 h sob agitação de 150 rpm;
- No teste de atividade de CMCase, a cepa AQ₆ produziu enzimas com a maior atividade (0,164 U/ml) a 45 °C após produção enzimática em meio contendo carboximetilcelulose a 40 °C sob agitação de 150 rpm por 36 h;
- Apesar de se observar atividade de celobiase e FPase, a cepa AAD₇ não apresentou atividade de CMCase nas temperaturas 45 e 60 °C;
- O efeito da temperatura sobre atividade de CMCase se mostrou diversificado, pois enquanto as enzimas produzidas pelas cepas AAG₁₆, AAP₇, AM₄, AQ₆, AS₀₃ e AY₇ apresentam maiores atividades a 45 °C, as cepas AAJ₆, AAO₁₄, AH₆-1, AH₆-2, AK₃, AM₁, AP₂ e AQ₃ apresentaram maiores atividades a 60 °C;
- A cepa AQ₆ apresentou maior atividade de celobiase entre as leveduras testadas. Foram obtidos 0,216 U/mL de celobiase após fermentação a 30 °C, 150 rpm por 120 h;
- O efeito do tempo de fermentação se mostra como importante fator na produção de celobiasas, pois quanto maior o tempo de fermentação (240 h), maior foi a atividade de celobiase apresentada, exceto para a cepa AQ₆, que produz enzimas com maior atividade após fermentação de 120 h;
- A cepa AY₇ apresentou maior atividade enzimática em papel de filtro. Foram obtidos 0,041 U/mL de FPase após fermentação a 30 °C, 150 rpm por 120h;

- Tempos de fermentação de 120 h favorecem a produção de enzimas capazes de degradar o papel de filtro, exceto para as cepas AAG₁₆, AAP₇ e AM₄, que produziram FPases com maiores atividades após fermentação de 240 h;
- Tempos de fermentação ainda menores para produção de FPases podem ser importantes para produção de enzimas com maiores atividades, tendo em vista que depois de 120 h atividades foram maiores que depois de 240 h de fermentação;

6. Sugestões para Trabalhos Futuros

- Estudo da produção de enzimas e gomas em meios submersos sob agitação, com utilização de biorreatores automatizados com variação na concentração de substrato utilizado, pH do meio, aeração, agitação, concentração de sais, temperatura, dentre outros, visando maior produtividade e eficiência enzimática;
- Estudos de purificação das enzimas, determinação das características bioquímicas e aplicabilidade industrial;
- Verificação da possibilidade de scale-up para produção das enzimas em larga escala, visando redução de custos;
- Identificação através de HPLC dos produtos sintetizados pelas cepas para avaliação da produção de insumos de interesse;
- Testes com as cepas de leveduras da cultura estoque para produção de outros insumos de interesse como lipases, glicose-oxidase, ácido cítrico, dentre outros;
- Utilização de substratos alternativos como amido bruto para produção de amilases, madeira tratada para produção de celulases ou, ainda, melaço de cana-de-açúcar para produção de gomas;
- Identificação do tipo de goma produzida pelas cepas consideradas potenciais produtoras de gomas.

7. Referências

- ABDELAL, A. T .H., KENNEDY, E. H. AHEARN, D. G. Purification and characterization of a neutral protease from *Saccharomycopsis lipolytica*. **Journal of Bacteriology** 130: 1125-1129, 1977.
- ADITIVOS & INGREDIENTES Cargill: O maior dos gigantes? **Aditivos & Ingredientes**, n. 10, p. 25-45. Setembro/outubro, 2000
- ALVES, M. H.; CAMPOS-TAKAKI, G. M.; PORTO, A. L. F.; MILANEZ, A. I. Screening of *Mucor spp.* For the production of amylase, lipase, polygalacturonase and protease. **Brazilian Journal of Microbiology**, 33:325-330, 2002
- ANAGNOSTAKIS, S. L.; HANKIN, L. Use of selective media to detect enzyme production by microorganisms in food products. **Journal of Milk and Food Technology**. 38 (10): 570-572, 1975
- ARMILIATO, L. Produção de Ácido Cítrico por *Candida lipolytica* NRRL Y 1095. **Tese de doutorado**. Departamento de Engenharia de Alimentos , Unicamp, 2004
- ATKINSON, B.; MAVITUNA, F.; Biochemical Engineering and Biotechnology Handbook, Second ed. New York: **Stockton Press**, 1991
- AZEMA, J.; CHEBLI, C.; BON, M. New surfactants with sugar-based polar heads derived from bile-acids - the n-ursocheryl-d-glucosamine and n-dehydrocheryl-d-glucosamine. **Journal of Carbohydrate Chemistry**. 14 (6): 805-817, 1995
- BARKER, P. E.; VLACHOGIANNIS, G.; ALSOP, R. M. Dextran fractionation on a semi-continuous countercurrent simulated moving-bed chromatograph. **Chromatographia**.17: 149-153, 1983
- BECKER, A.; KATZEN, F.; PUHLER, A.; IELPI, L. Xanthan gum biosynthesis and application: a biochemical / genetic perspective. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 50, 145–152, 1998

- BERGMEYER, H. U. **Methods of enzymatic analysis**. Volum IV: Enzymes 2: esterases, glycosidases, lyases, ligases, 178-188, 1984
- BOSCHERO, A. C. Estudo dos mecanismos de secreção e ação da insulina em diferentes modelos animais: neonatos, desnutridos, hiperlipidêmicos e resistentes à insulina. watson.fapesp.br/Tematico/biol/physiolo.htm, 2005
- BUCHHOLZ, K.; PULS, J.; GODELMANN, B.; DIETRICH, H. H. Hydrolysis of cellulosic wastes. **Process Biochem.** 37-43, 1981
- CANEVASCINI, G.; GATTLEN, C. A comparative investigation of various cellulase assay procedures. **Biotechnol. Bioeng.** 23, 1573-1590, 1981
- CASTRO, M. M. S. **Leveduras contaminantes do processo de fermentação alcoólica: diversidade taxonômica e metabólica** Campinas, Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) - UNICAMP, 124 p. (1995)
- CARVALHO, A. C. M., DACAL, L. B., FERREIRA, L. F. P., LUCARINI, A. C., PESSOA-JR, A. **Influência do pH e da temperatura na estabilidade e na velocidade de reação da enzima glicose-oxidase**. Revista Pesquisa e Tecnologia FEI. São Bernardo do Campo: , v.22, p.39 - 43, 2002
- CHEN, W.; LIU, C. Production of β -fructofuranosidase by *Aspergillus japonicus* **Enzyme and Microbial Technology**, v.18, n.02, p.153-160 (1996)
- CORDEIRO, C. A. M.; MARTINS, M. L. L.; LUCIANO, A. B. Production and properties of alpha-amylase from thermophilic *Bacillus* sp. **Brazilian Journal of Microbiology**, 33 (1): 57-61, 2002
- COSTA, F. A. A. **Estudo da produção de ácido cítrico por *Candida lipolytica* Y 1095**. Campinas 2000. Departamento de Engenharia de Alimentos, Unicamp.
- DE BELDER, A. N. Industrial Gums: Polysaccharides and their derivatives, edited by R.L.Whistler and J.N. BeMiller (**Academic Press, Inc.**, 1993) pp. 399-425.
- DEKETELAERE, A.; DEMEYER, D.; VANDEKERCKHOVE, P. E VERVAEKE, I. Stoichiometry of carbohydrate fermentation during dry sausage ripening. **J. Food Sci.** 39:297-300, 1974.

- DEMAIN, A. L. Small bugs, big business: the economic power of the microbe. **Biotechnol Adv**, 2000; Cap. 18, p. 499-514.
- DEXTRAN DERIVATIVES. Página na internet: <http://www.dextran.dk>. 2005
- EFFIO, P. C.; SILVA, E. F.; PUEYO, M. T. A simple and rapid method for screening amylolytic bacteria. **Biochemical Education**, 28: 47-49, 2000
- FIEDURECK, J.; ROGALSKI, J.; ILCZUK, Z.; LEONOWICZ, A. Screening and mutagenization of molds for the improvement of glucose oxidase production. **Enzyme Microbiology. Technology**. 1986, 8. p. 734-736
- FIOS. <http://www.starch.hpg.ig.com.br/Amido.htm>, 2006
- FIGUEIRA, E. L. Z.; HIROOKA, E. Y. Culture medium for amylase production by toxigenic fungi. **Brazilian Archives of Biology and Technology**. 43:461-467, 2000
- FONTANA, J. D. **PI 0002001**. Hidrólise fosfórica de amidos, 2002
- GALINDO, E.; SALCEDO, G.; RAMIREZ M. E. Preservation of *Xanthomonas campestris* on agar slopes - effects on xanthan production. **Applied Microbiology and Biotechnology**. 40 (5): 634-637,1994
- GALLIARD, T. Starch: properties and potential. [S. L.]:**Society of Chemical Industry**, 1987
- GARCIA-OCHOA, F.; SANTOS, V. E.; CASAS, J. A.; GÓMEZ, E. Xanthan gum: production/recovery and properties. **Biotechnol, Adv**. 2000, p. 549-579
- HAWORTH, S.; JONES, D. M.; ROBERTS, J. G. Quantitative determination of mixtures of alkyl ethers of D-glucose .2. structural studies of partially methylated cotton cellulose. **Carbohydrate Research**. 10 (1): 1& 1969
- HENRY, R. J.; CANNON, D. C.; WINKELMAN, J. Clinical chemistry principles an techniques, 2 ed. **Harper and Row Publishers Inc**. N.Y. p. 1288, 1974
- HERNALSTEENS, S. Isolamento, identificação e caracterização de microrganismos produtores de oligossacarídeos a partir de coletas em diferentes regiões

- brasileiras. Campinas, Tese (**Doutorado em Engenharia de Alimentos**) – UNICAMP, 2004
- IBAMA - [http\\www.ibama.gov.br](http://www.ibama.gov.br)
- JAY, J. M. Microbiologia moderna de los alimentos. 3ª ed. **Editora Acribia**, 804 p., 1992
- JU, L-K.; ZHAO, S. Xanthan fermentation in water/oil dispersions. **Biotechnol Tech**; 7:463–8, 1993
- KALOGIANNIS, S.; IAKOVIDOU, G.; LIAKOPOULOU-KYRIAKIDES, M.; KYRIAKIDIS, D. A; SKARACIS, G. N. Optimization of xanthan gum production by *Xanthomonas campestris* grown in molasses. **Process Biochemistry**. 2003, p. 249-256
- KANG, S. W.; PARK, Y. S.; LEE, J. S.; HONG, S. I.; KIM, S. W. Production of cellulases and hemicellulases by *Aspergillus niger* KK2 from lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**. 91, 153–156, 2004
- LADISCH, M. R.; LIN, K.W.; VOLOCH, M.; TSAO G. T. Process considerations in the enzymatic hydrolysis of biomass. **Enzyme Microb. Technol.** 5, 82-102, 1983
- LAI, T. E.; PULLAMMANAPPALLIL, P. C.; CLARKE W. P. Quantification of cellulase activity using cellulose-azure. **Talanta**, 5 pages, 2005
- LEBRUN, L.; JUNTER, G. A.; JOUENNE, T.; MIGNOT, L. Exopolysaccharide production by free and immobilized microbial cultures. **Enzyme Microb Technol**; 16:1048–54, 1994
- LEE, Y.-H.; FAN, L. T. Kinetic studies of enzymatic hydrolysis of insoluble cellulose: analysis of initial rates. **Biotechnol. Bioeng.** 24, 2383-2406, 1982
- LEE, S. J.; LEE, K. S.; KIM, S. R.; GUI, Z. Z.; KIM, Y. S.; YOON, H. J.; KIM, I.; KANG, P. D.; SOHN, H. D.; JIN, B. R. A novel cellulase gene from the mulberry longicorn beetle, *Apriona germari*: Gene structure, expression, and enzymatic activity. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Part B 140, 551–560, 2005

- LIAKOPOULOU-KYRIAKIDES, M.; TZANAKAKIS, E. S.; KIPARISSIDIS, C.; EKATERIANIADOU, L. V.; KYRIAKIDIS, D. A. Kinetics of xanthan gum production from whey by constructed strains of *Xanthomonas campestris* in batch fermentations. **Chem. Eng. Technol.** 1997; 20:354–60.
- LÓPEZ, M. J.; MORENO, J.; RAMOS-CORMENZANA, A. *Xanthomonas campestris* strain selection for xanthan production from olive mill wastewaters. **Pergamon**, p. 1828-1830, 2000
- MALTO, M.L. Estudo da metodologia para caracterização de leveduras da fermentação alcoólica industrial através de taxonomia numérica e potencial fermentativo Campinas, Dissertação (**Mestrado em Engenharia de Alimentos**) - UNICAMP, 138 p. (1997)
- MATTEY, M. The production of organics acids. **Critical Reviews in Biotechnology**, 12:87-132, 1992
- MENDELS, M.; STERNBERG, D. Recent advances in cellulase technology. **J. Ferment. Technol.** 54, 267-286, 1976
- MENDES, B. A. & COELHO, E. M. **Considerações sobre características de mel de abelhas – Análises e critérios de inspeção**. Informe Agropecuario, v.9, n.106, p. 56-67, 1983.
- MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Anal. Chem.**, v.31, p.426-428 (1959)
- MILLER, G. L.; BLUM, R.; GLENNON, W. E.; BURTON, A. L. Measurement of carboxymethylcellulase activity. **Anal. Biochem.** 2, 127-132, 1960
- MOREIRA, F. G.; LIMA, F. A.; PEDRINHO, S. R. F.; LENARTOVICZ, V.; SOUZA, C. G. M.; PERALTA, R. M. Production of amylases by *Aspergillus tamarii*. **Braz. J. Microbiol.** 30:157-162, 1999
- NELSON, N. A photometric adaption of the Somogyi method for the determination of glucose. **J. Biol. Chem.** 153, 375-380, 1944

- NISIZAWA, T.; SUZUKI, H.; NISIZAWA, K. Catabolite repression of cellulase formation in *Trichoderma viride* **J. Biochem.** 71, 999, 1972
- NWUFO, M. I.; FAJOLA, A. O. Production of amylolytic enzymes in culture by *Botryodiplodia theobromae* and *Sclerotium rolfsii* associated with the corn rots of *Colocasia esculenta*. **Acta Microbiologica Hungarica.** 35:371–378, 1988
- OKADA, G.; NISIZAWA, K. enzymatic studies on a cellulase system of *Trichoderma viride*, III. Transglycosylation properties of two cellulase components of random type. **J. Biochem.** 78, 297-306, 1975
- OGAWA, K.; TOYAMA, H.; TOYAMA, N. Native cellulose hydrolyzing cellulase of *Trichoderma reesei*. **J. Ferment. Technol.**, vol. 60, n. 4, p. 349-355, 1982
- PAPAGIANNI, M.; PSOMAS, S. K.; BATSILAS, L.; PARAS, S.V.; KYRIAKIDIS, D.A.; LIAKOPOULOU-KYRIAKIDES, M. Xanthan production by *Xanthomonas campestris* in batch cultures. **Process Biochemistry**, p. 73-80, 2001
- QUEIROZ, J. H. Contribuição ao estudo da produção de dextrana-sacarase por *Leuconostoc mesenteroides*. Campinas-SP. Faculdade de Engenharia de alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 1987. 118p. **Dissertação de Mestrado**
- RAJOKA, M. I. Influence of various fermentation variables on exo-glucanase production in *Cellulomonas flavigena*. **Electronic Journal of Biotechnology**, 7, 259-266, 2004
- RAJOKA, M. I.; MALIK K. A. Cellulase production by *Cellulomonas biazotea* cultured in media containing different cellulosic substrates. **Bioresource Technology** 59, 21-27, 1997
- REESE, E. T.; SIU, R.G. H.; LEVINSON, H. S. The biological degradation of soluble cellulose derivatives and its relationship to the mechanism of cellulose hydrolysis **J. Bacteriol.** 59, 485, 1950
- ROBINSON, D. K.; WANG, D. I. C. A novel bioreactor system for biopolymer production. **Ann. N.Y. Acad. Sci.** 506:229–41, 1988

- RODRIGUES, S. **Estudo da síntese enzimática de dextrana na presença de maltose como aceptor**. Campinas-SP: [s.n.], 2003. Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química, Tese de Doutorado
- RUNDLE, R. E.; BALDWIN, R. R. The configuration of starch and starch-iodine complex. **Journal of American Chemical Society**. 65: 554-561, 1943
- SANDERMA, W.; SCHMIDT, H. Efficiency of some organic compounds against reticulitermes-flavipes (kollar). **Holz als Roh-Und Werkstoff**. 31 (2): 71-73, 1973
- SANTOS, E. O; MARTINS, M. L. L. Effect of the medium composition on formation of amylase by *Bacillus sp.* **Brazilian Archives of Biology and Technology**, 46 (1): 129-134, 2003
- SATO, F.; OKUYAMA, M.; NAKAI, H. Glucoamylase originating from *Schwanniomyces occidentalis* is a typical alpha-glucosidase. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**. 69 (10): 1905-1913, 2005
- SCHEPARTZ, A.I. & SUBERS, M.H. Catalase in honey. **Journal of Apicultural Research**, v.5, n.1, p. 37-43, 1966
- SOMOGYI, M. Notes on sugar determination. **J. Biol. Chem.** 195, 19-28, 1952
- STAMFORD, T. L. M.; ARAÚJO, J. M.; STAMFORD, N. P. Atividade enzimática de microrganismos isolados do Jacatupé (*Pachyrhizus erosus* L. Urban). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v. 18 n. 4 Campinas, 1998
- STAUDINGER, H.; EICHER, T. Über die quellung resp inclusion der cellulose mit niederen fettsauren. **Makromolekulare Chemie-Macromolecular Chemistry And Physics**. 10 (3): 254-260 1953
- STREDANSKY, M.; CONTI, E. Xanthan production by solid state fermentation. **Process Biochemistry**, p. 581-587, 1996
- SUTHERLAND, I. W. Novel and established applications of microbial polysaccharides. **Trends Biotechnol.** 1998; Cap. 16, p. 41-60

- SWINKELS, J. J. M. Composition and properties of commercial native starches. **Starke**. 37: 1-5, 1985
- TEITELBAUM, R.C.; RUBY, S.L.; MARKS, T.J. .A ressonance raman/iodine Mossbauer investigation of the strach-iodine structure. Aqueous solution and iodide vapor preparations. **J. Amer. Chem. Soc.**102: 3322 – 3328, 1980
- UGURU, G. C.; AKINYANJU, J. A.; SANI, A. The use of yam peel for growth of locally isolated *Aspergillus niger* and amylase production. **Enzyme and Microbial Technology**. 21: 48-51, 1997
- WANDERLEY, K. J.; TORRES, F.A.G.; MORAES, L.M. P., ULHOA, C. J. Biochemical characterization of α -amilase from the yeast *Cryptococcus flavus*. **Fems Microbiology letters**, v.231, p.165-169, 2004
- WECKER, A; ONKEN, V.; Influence of dissolved oxygen concentration and shear rate on the production of pullulan by *Aureobasidium pullulans*. **Biotechnol Lett**; 13:155–60, 1991
- WEI, Y. D.; LEE, S. J.; LEE, K. S.; GUI, Z. Z.; YOON, H. J.; KIM, I.; JE, Y. H.; GUO, X.; SOHN, H. D.; JIN, B. R. N-glycosylation is necessary for enzymatic activity of a beetle (*Apriona germari*) cellulase. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. 329, 331–336, 2005
- WERNEAU, W. C.; **US Patent** 4,282,321; 1981
- WESTON, R. J., BROCKLEBANK, K. L., LU, Y. Identification and quantitative levels of antibacterial componentes of some New Zealand honeys. **Food Chemistry (70)**: p.427-35, 2000.
- WHISTLER, R. L.; THORNBURG, W. L. Development of starch granules in corn endosperm. **Journal Agricultural and Food Chemistry**. Washington DC. v.5 203-207, 1957
- WHITE, J. W. Physical characteristics of honey. In: CRANE, E. **Honey a comprehensive survey**. London: Heinemann, Cap.6, p.207-239, 1975

- WHITE, J. W. & SUBERS, M.H. & SHEPARTZ, A.I. The identification of inhibine, the antibacterial factor in honey, as hydrogen peroxide and its origin in a honey glucose oxidase system. **Biochemical et Biophysical Acta**, v.73, p. 57-70, 1963.
- WOOD, T. M.; McCRAES. I. The purification and properties of the C1 component of *Trichoderma koningii* cellulase. **Biochem. J.** 128:1183-1192, 1972
- YANG, S-T; LO, Y-M; MIN, D. B. Xanthan gum fermentation by *Xanthomonas campestris* immobilized in a novel centrifugal fibrous-bed bioreactor. **Biotechnol. Prog.** 12:630–637, 1996